

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“Evaluación antioxidante y antienzimática *in vitro* y
antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de
la *Caesalpinia spinosa* “tara”.”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico

AUTOR

Wilder Javier Nuñez Enero

Raomir Quispe Tapara

ASESOR

Dr. Américo Castro Luna

Lima-Perú

2015

DEDICATORIA

A mis padres Roberto y Felicitas por darme la vida y educarme en la verdad y el amor, porque son mi ejemplo y sentaron las bases de mi desarrollo personal y profesional. Por siempre apoyarme incondicionalmente y depositar toda su confianza en los planes y proyectos.

A mis hermanas Gaby y Weny por el inmenso amor, comprensión y apoyo incondicional que me dieron para realizar todo lo que me propuse.

Y a Celine, porque llenas mi vida de amor y felicidad a cada segundo, y a mis familiares por brindarme su amistad sincera, apoyo y cariño en todo momento.

Raomir Quispe Tapara

DEDICATORIA

A mi madre Zoila.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

A mi padre Alejandro.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizaban y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos.

Por su gran apoyo emocional durante el tiempo en que cursaba mi carrera, por ser buenos ejemplos a imitar.

A mis maestros.

Por sus enseñanzas brindadas y hacer de mi un hombre de bien en lo profesional y personal.

A mis amigos.

Por ser parte del día a día de mi desarrollo profesional y personal.

Wilder Javier Nuñez Enero

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor Dr. Américo Castro Luna y Co asesora Dra. Gloria Gordillo Rocha por su asesoría, orientación y contribuciones durante el desarrollo de toda la investigación.

A los miembros del jurado: Dra. Augusta Córdova, Dra. Arilmi Gorriti, Mg. Carmen Arana y Mg. Margarita Lobatón por sus recomendaciones y sugerencias recibidas para mejorar la presente tesis.

A todos los profesores abnegados y sacrificados de nuestra facultad porque cuando imparten sus conocimientos y enseñanzas contribuyen al desarrollo de nuestra maravillosa profesión y del país.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

DPPH^{•+}: Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

ABTS^{•+}: Acido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

MEC: Matriz extracelular

PPE: Elastasa pancreática porcina

HNE: Elastasa de neutrófilos humana

PGG: Pentagaloil glucosa

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

EGCG: Epigallocatequina galato

COMT: Catecol O-metil transferasa

AA: Acido araquidónico

PGE2: Prostaglandina E2

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducida

COX: Ciclooxygenasa

SOD9: Superoxidasa dismutasa

APX: Ascorbato peroxidase

DHAR: Dehidroascorbato reductasa

MDHA: Monodehidroascorbato

GAG's: Glicosaminoglicanos

IC50: Concentración de inhibición de la mediana

RESUMEN

Con miras a explorar el potencial de la *Caesalpinia spinosa* (tara) para el desarrollo de productos químicos que mejoren la calidad de vida, en el presente trabajo se sometió a métodos químicos e enzimáticos *in vitro* determinando sus actividades antioxidantes, anticolagenasa, antielastasa, y la actividad inflamatoria fue evaluada *in vivo* mediante el modelo de inducción de edema plantar inducido por carragenina. Para la evaluación de las actividades se utilizó el extracto hidroalcohólico de la tara. La actividad antioxidante fue evaluada mediante la neutralización del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH^{•+}) y el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS^{•+}) mostrando actividad antioxidante ($EC_{50}=4.52 \mu\text{g/mL}$ y $EC_{50}=14.48 \mu\text{g/mL}$ respectivamente) inclusive mayor que la del patrón de referencia trolox ($EC_{50}=5.04 \mu\text{g/mL}$ y $EC_{50}=17.04 \mu\text{g/mL}$ respectivamente). Las actividades antienzimáticas se evaluó por el método descrito por Thring et al, en el cual se aprecia mayor potencial de inhibición de la enzima colagenasa ($IC_{50}=196.752 \mu\text{g/mL}$) respecto al control positivo epigallocatequina galato ($IC_{50}=216.991 \mu\text{g/mL}$). La actividad antiinflamatoria fue evaluada en 30 ratas albinas de la cepa Holtzman con un peso promedio de 200 ± 50 g distribuidas al azar en 5 grupos de 6 ratas cada uno; considerando un control con suero fisiológico, tres con el agente inductor de la inflamación más el extracto hidroalcohólico en dosis de 50, 100 y 250 mg/kg de peso, y un fármaco estándar (Indometacina). La inflamación disminuyó en 44.854 % del extracto de 250 mg/kg a la sexta hora, sin embargo a la misma hora, la indometacina 5 mg/kg disminuyó en 48.267 %. Así mismo los demás extractos de 100 y 50 mg/kg también disminuyeron el edema, pero en menor proporción que el estándar. Todos los valores obtenidos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett o Tukey con un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0,05$) mostrando diferencias significativas en las medias de cada extracto en el transcurso de las horas. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de la especie estudiada presenta la actividad antioxidante, antienzimática y antiinflamatoria.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa* (tara), actividad antioxidante, antienzimática, antiinflamatoria.

ABSTRACT

In order to explore the potential of *Caesalpinia spinosa* (tara) for the development of chemicals that improve sample quality of life, in this paper he was subjected to chemical and enzymatic methods in vitro by determining its antioxidant, anti-collagenase and elastase activities, and inflammatory activity was assessed in vivo by induction model carrageenan induced edema. The alcoholic extract of the tara was used for the evaluation of the activities. The antioxidant activity was evaluated by neutralizing the radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazilo (DPPH^{•+}) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) showing antioxidant activity ($EC_{50} = 4.52$ mg/ml and $EC_{50} = 14.48$ mg/mL respectively) even larger than the reference pattern trolox ($EC_{50} = 5.04$ mg/ml and $EC_{50} = 4.17$ mg/mL respectively). The anti-enzymatic activities were evaluated by the method described by Thring et al., in which greater potential enzyme collagenase inhibition ($IC_{50} = 196.752$ g/mL) compared to the positive control epigallocatechin gallate ($IC_{50} = 216.991$ g/mL) was observed. The anti-inflammatory activity of the alcoholic extract of the pod tara was evaluated in 30 albino rats of Holtzman strain with an average weight of 200 ± 50 g distributed randomly into 5 groups of 6 rats each; considering saline control, with three inflammation inducing agent plus the hydroalcoholic extract in doses of 50, 100 and 250 mg/kg, and a standard drug (indomethacin). Inflammation decreased by 44.854 % of the extract of 250 mg/kg at the sixth hour, but at the same time, indomethacin 5 mg/kg decreased by 48.267 % .So it the other extracts of 100 and 50 mg/kg also reduced edema, but by less than the standard. All values obtained were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Tukey test with a confidence level of 95 % ($p < 0.05$) showing significant differences in the means of each extract in the course of hours. We conclude that the alcoholic extract of the test species has antioxidant, anti-enzymatic and anti-inflammatory activity.

Key words: *Caesalpinia spinosa* (tara), antioxidant, anti-enzymatic, anti-inflammatory activity.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos	7
2.2.1. Clasificación sistemática	7
2.2.2. Características morfológicas	7
2.2.3. Distribución geográfica	9
2.2.4. Propiedades medicinales	10
2.3. Aspecto químico	11
2.3.1. Composición química de la tara	11
2.3.2. Compuestos fenólicos	11
2.3.3. Taninos	13
2.3.4. Flavonoides	25
2.4. Actividad biológica	39
2.4.1. Actividad antiinflamatoria	39
2.4.2. Actividad antioxidante	54
2.4.3. Actividad antienzimática	66
III. PARTE EXPERIMENTAL	75
3.1. Materiales y métodos	75
3.2. Entidades dónde se desarrolló la investigación	76

3.3. Tipo de investigación	76
3.4. Flujograma de trabajo experimental	77
3.5. Recolección del material	77
3.6. Preparación del extracto hidroalcohólico	78
3.7. Estudio farmacognóstico	79
3.7.1. Prueba de solubilidad	79
3.7.2. Marcha fitoquímica	79
3.8. Estudio farmacológicos	79
3.8.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria	79
3.8.2. Determinación de la actividad antioxidante	81
3.8.3. Determinación de la actividad antienzimática	84
3.9. Análisis estadístico	86
IV. RESULTADOS	87
4.1. Estudio farmacognóstico	87
4.1.1. Marcha fitoquímica	87
4.2. Estudio farmacológico	88
4.2.1. Actividad antiinflamatoria	88
4.2.2. Actividad antioxidante	90
4.2.3. Actividad antienzimática	94
V. DISCUSIÓN	98
VI. CONCLUSIONES	107
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
VIII. ANEXOS	121

I. INTRODUCCIÓN

La “tara” es una planta originaria del Perú empleada desde la época prehispánica en la medicina popular y en años recientes, como materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios¹. En la medicina, se utiliza popularmente para combatir faringitis, fiebres, afecciones a la garganta, lavado de heridas, úlceras y resfríos². La presencia de taninos, flavonoides y gomas hacen que esta planta tenga uso medicinal³. Los taninos y flavonoides son metabolitos secundarios con efecto protector ante daños oxidativos^{4,5}. Los antioxidantes son sustancias que hallándose presentes a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable, retarda o previene la oxidación de ese sustrato⁶. La exposición de la piel a la luz solar genera la liberación de citoquinas pro-inflamatorias e inmunosupresoras. Asimismo, produce especies reactivas de oxígeno, las cuales reaccionan con el ADN, proteínas, ácidos grasos, causando envejecimiento prematuro de la piel caracterizado por hiper/hipopigmentación de la piel, pérdida de elasticidad, arrugas y riesgo de cáncer a la piel. En los últimos años se ha despertado interés por los metabolitos secundarios y extractos de plantas que tienen efectos anticolagenasa y actividades antielastasa. Algunas plantas contienen amplia variedad de constituyentes químicos, como polifenoles: flavonoides, tocoferoles, ácidos fenólicos y taninos que pueden tener la propiedad de compuestos inhibidores de polifenoles: catequina, galato de epigallocatequina (EGCG) e inhibidores de la colagenasa y elastasa⁷. Los mencionados son poderosos bioflavonoides con fuerte actividad antioxidante. Triterpenoides como

ácido boswélico aislado en resinas, se ha demostrado también su actividad antielastasa⁸.

La vaina es la parte más importante del fruto de la “tara”, ya que allí se concentran los mayores niveles de taninos, que se obtienen por pulverización de la cáscara de la vaina⁹. El Perú es el principal abastecedor de “tara”, gracias a que posee climas y suelos que hacen posible el desarrollo de esta especie en numerosos departamentos del país. Sin embargo, pese a su importancia económica y ecológica aún no hay estudios integrales acerca de las características bioquímicas y genéticas de este recurso; ni tampoco estudios bioquímicos y genéticos relacionados con su procedencia geográfica.

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro*,
2. Evaluar la actividad antielastasa y anticlagenasa *in vitro* y
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la “tara” procedente de la provincia de Huanta, región de Ayacucho que permita corroborar sus posibles efectos medicinales.

Las hipótesis son:

1. El extracto hidroalcohólico de la vaina de tara posee efecto antioxidante.
2. El extracto hidroalcohólico de la vaina de tara posee efecto antielastasa y anticlagenasa.
3. El extracto hidroalcohólico de la vaina de tara posee efecto antiinflamatorio.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

El efecto antibacteriano del extracto acuoso de las vainas de *C. spinosa*, en concentraciones que corresponden a 17.5, 16.25, 15, 13.75, 12.5, 11.25, 10, 8.75, 7.5, 6.25 Rg/ml, en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, usando inóculos estandarizados con el Nefelometro de McFarland N° 0.5. Inhibió el crecimiento de *S. aureus* cuyo CMI fue de 12.5 Rg/ml y el CMB fue de 15 Rg/ml; para la inhibición de *S. pyogenes* el CMI fue de 13.7 Rg/ml y el CMB fue de 16.25 Rg/ml. Se determinó que el extracto acuoso de *C. spinosa* “tara” tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus* y *S. pyogenes*¹⁰.

El efecto antiinflamatorio de una pasta dental conteniendo tara en el tratamiento de gingivitis marginal crónica. Al grupo experimental compuesto por 64 niños a quienes se les aplicó esta pasta dental; el sangrado gingival desaparece al noveno día, el enrojecimiento y el edema gingival desaparece al doceavo día y la presencia de puntillado al décimo quinto día, a diferencia lo que ocurre al aplicarse una pasta dental placebo (grupo control)¹¹.

En el estudio realizado, el ensayo clínico para el tratamiento curativo de la gingivitis crónica con preparaciones, a manera tradicional, de vainas de *C. spinosa* “tara”, demostrando su eficacia al desaparecer los indicadores clínicos de

inflamación gingival en pocas sesiones (6-8 días, 3-4 sesiones) en comparación con el grupo control que utilizó el doble de tiempo, lo que se demostró con este ensayo la propiedad hemostática, antiséptica, antiinflamatoria, anestésica y cicatrizante de la tara. El experimento se realizó con 20 pacientes en dos grupos: experimental y control; el preparado se obtuvo por cocimiento de 3 - 4 vainas y se aplicó en forma tópica y enjuagatorios. El grupo control sólo se trató por destartraje e higiene¹².

Estudió a la tara botánicamente y lo menciona como una planta medicinal de uso popular nativa del Perú y de América¹³.

En los últimos años, ha despertado en la población un gran interés por los productos naturales para prevenir el daño inducido por radiación UV. En tal sentido, las plantas más promisorias para prevenir los daños causados por la radiación solar son aquellas que posean actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora y antioxidante¹⁴.

Caesalpinia spinosa “tara” es una planta originaria del Perú utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica o popular y en años recientes, como materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios. Estudios realizados en nuestro país, demostraron que en los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ancash, Lambayeque, Amazonas, Ayacucho, Apurímac y Huánuco; existen plantaciones silvestres del árbol de “tara”, cuyos frutos, cuando están maduros, pueden contener entre 30 a 60% de taninos, que sirven como base para

la elaboración de otros productos utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y peletera¹⁵.

Los antioxidantes naturales están adquiriendo cierta predominancia sobre los sintéticos ya que la utilización de estos está restringida en varios países, debido a los posibles efectos negativos que puedan generar en la salud humana, mientras que los antioxidantes de origen natural se consideran más seguros¹⁶.

La exposición de la piel a la luz solar genera liberación de citoquinas pro-inflamatorias e inmunosupresoras. Asimismo, produce especies reactivas de oxígeno (ROS), que reaccionan con el ADN, proteínas y ácidos grasos, causando envejecimiento prematuro de la piel caracterizado por hiper/hipopigmentación de la piel, pérdida de elasticidad, arrugas y riesgo de cáncer en piel¹⁷.

El envejecimiento es un proceso complejo caracterizado por cambios morfológicos y funcionales en la piel influenciado por factores intrínsecos (envejecimiento cronológico) como extrínsecos (fotoenvejecimiento). Estos desórdenes son causados principalmente por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando estrés oxidativo y activación desbalanceada de proteasas dérmicas teniendo como consecuencia la degradación de la matriz extracelular (MEC) y aparición de arrugas, pérdida de elasticidad y firmeza, señales notorias del envejecimiento¹⁸.

El daño en la piel inducido por radiación ultravioleta (UV) acelera la degradación de las proteínas de MEC, incluyendo colágeno, elastina, proteoglicanos, y fibronectina, entre otros¹⁹.

La inhibición de la actividad elastasa por diversos aceites esenciales se evaluó en dos enzimas elastasa: elastasa pancreática porcina (PPE) y elastasa de neutrófilos humana (HNE)²⁰.

La búsqueda de principios activos para elaborar medicamentos ocupa un lugar importante en la investigación, la amplia flora del Perú nos muestra una gran biodiversidad de especies muchas con propiedades terapéuticas. En los últimos años se ha retornado al uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos; validar el uso popular y proponer un tratamiento alternativo de la inflamación²¹.

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de los tallos con hojas, frutos verdes y frutos maduros mostró presencia de taninos, esteroides, triterpenos, además los tallos con hojas y frutos maduros presentan saponinas. Los extractos alcohólicos y acuosos de los órganos de la planta manifiestan un efecto antiinflamatorio alto y las pruebas toxicológicas agudas no presentaron alteración en los animales de experimentación²².

En el Perú, últimamente se han realizado diversos estudios en diferentes plantas medicinales, comprobándose las propiedades de sus componentes como: antibacterianas, antihemorrágicas, analgésicas y antiinflamatorias. La tara es una planta oriunda del Perú, la cual es más usada en la industria peletera o en la

producción de goma de tara. Esta planta tiene amplia utilización empírica, por sus propiedades curativas en: infecciones bronquiales, como antiinflamatorio, casos de sinusitis; infecciones vaginales y micóticas, heridas crónicas y piezas dentales con caries dental. Hay escasos estudios científicos que lo comprueben²³.

2.2. Aspectos botánicos

2.2.1. Clasificación sistemática

Ubicación taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist.

Nombre científico: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Taxonomía

Reino: *PLANTAE*

División: *MAGNOLIOPHYTA*

Clase: *MAGNOLIOPSIDA*

Subclase: *ROSIDAE*

Orden: *FABALES*

Familia: *FABACEAE*

Género: *Caesalpinia*

Especie: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze.



Nombre vulgar: “tara”

Fuente: Constancia emitida por el Museo de Historia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Anexo N° 1).

2.2.2. Características morfológicas

La *Caesalpinia spinosa* “tara” es un árbol de 3 – 5 m de altura, que puede llegar a medir hasta 10 metros. Desde su base es muy ramificada y posee espinas fuertes,

agudas y rojizas de 4mm de largo. Sus hojas son de 9 a 13 cm de largo, con flores vistosas, al inicio amarillas y posteriormente rojizas.

Sus frutos son vainas aplanados de color naranja, de 8 a 10 cm de largo y 2 cm de ancho aproximadamente que contienen de 4 a 7 granos de semilla redondeadas de 0.6 a 0.7 cm de diámetro pardo negruzco a maduros. Cada árbol de tara puede rendir un promedio de 20 a 40 kg de vaina en cosechas 2 veces al año. El promedio de vida de un árbol de tara es 100 años y el cultivo se distribuye entre los 4° y 32° S²⁴.

Frutos y semillas: Los frutos, son vainas tipo lomento encorvadas, indehiscentes de 1,5-2,5 cm de ancho por 8-10 cm de largo, de color naranja-rojizo, su producción y tamaño varía de acuerdo al clima del lugar donde se desarrolla el árbol. Las semillas, son ovoides, ligeramente aplanadas, presentan un epispermo comestible y transparente, cuando maduran son blandas y al secar se vuelven duras, son de color pardo oscuro o negruzcas y brillosas por estar cubiertas de un tegumento impermeable.

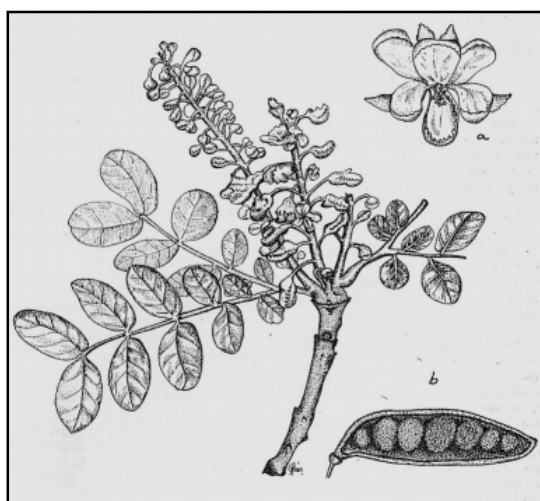


Figura 1. Hojas y fruto maduro de la tara (*Caesalpinia spinosa* Molina Kuntze)²⁵

2.2.3. Distribución geográfica

La distribución natural de la tara en el Perú fue descrita por el Dr. Weberbauer de la siguiente manera:

- En la costa: En las colinas de suelo arcilloso o pedregoso, en la sección sur (Arequipa, parte de Ica) y en Lima (Cañete y Lima).
- En los Andes: En los andes occidentales del sur, en los valles de Corumas, de Cotahuasi, de Coracora y del río Lomas, entre una altura de 900 y 2000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).
- En las vertientes occidentales de los Andes de Perú central: En los valles del río Pisco, entre 800 y 2000 m.s.n.m., del río Rímac entre los 2400 y 2900 m.s.n.m. y en los Ocos entre 2300 y 2900 m.s.n.m.; en el Nepeña, entre 2000 y 2800 m.s.n.m. En el río Santa entre los 2000 y 2800 m.s.n.m. En los valles de Chuquicasa y sus originarios: Conchucos, Pampas, Santiago de Chucos entre 1550 y 2800 m.s.n.m.
- En el flanco izquierdo de los valles del Apurímac con límite superior de 3150 m.s.n.m.
- En los valles del Mantaro, la tara caracteriza las laderas desde Ayacucho hasta el río Pongora.
- En los valles del Campoden, Salahual, Sunchubamba, del sistema de río Chicama; en el sistema del río Jequetepeque entre los 1800 y 2800 m.s.n.m.
- En las vertientes occidentales del extremo norte y los valles interandinos del mismo se encuentra la “tara” entre los 2000 y 2500 m.s.n.m.

- Sobre Olmos en las vertientes entre 1300 y 2200 m.s.n.m. En Querecotillo y Cutervo entre 1700 y 2200 m.s.n.m¹³.
- La tara se distribuye en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huánuco, Junín, Moquegua, Tacna y Lima¹¹.

La tara crece en los climas secos, cálidos y subcálidos de la costa, en la vertiente occidental de los andes y valles interandinos. La tara es una especie muy plástica en clima y suelo.

No es exigente en suelos, se desarrolla por su sistema radicular circular, que le permite afrontar la sequedad del suelo, crece bien en suelos francos, franco arenosos y pedregosos, con pH ligeramente ácido a medianamente alcalino (pH 6 – 7.5). Es frecuente encontrarla en suelos lateríticos muy erosionados. No tolera suelos alcalinos ni soporta heladas¹¹.

2.2.4. Propiedades medicinales

La *Caesalpinia spinosa* “tara” tiene una amplia utilización empírica. Desde la época incaica es usada por sus propiedades curativas como: antiinflamatorio, en forma de gárgaras para infecciones bronquiales, sinusitis; como agua de lavado para los ojos inflamados, infecciones vaginales y micóticas, heridas crónicas y en piezas dentales con caries dental; como bebida para el dolor de estómago, las diarreas, cólera, reumatismo y como depurativo del colesterol. El uso tradicional de la tara para el tratamiento de problemas de la salud constituye un recurso alternativo^{10,26,27,28,29}.

2.3. Aspecto químico

2.3.1. Composición química de la tara

Vainas: taninos hidrolizables (galotaninos) en rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los esteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquinica y de 3,4,5- tri-O-galoilquinico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquinico y 3,4,5-tri-O-galoilquinico^{30,31}.

Semillas: Endospermo se ha separado la goma o hidrocoloide galactomananico en la que los componentes monoméricos galactosa y manosa se encuentran en una relación de 41:70. La viscosidad intrínseca permitió determinar su peso molecular promedio en 351400, así mismo la goma da lugar a soluciones acuosas con característica de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp³².

2.3.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo compuestos químicos que poseen anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, frecuentemente como glucósidos. Relativamente polares, tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el color verde, purpura o azul o negro que producen cuando se agrega una solución acuosa al 1% de cloruro férrico. Dada la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos, muestra intensa absorción en la región UV del espectro, siendo este método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo³³.

Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono que forman su esqueleto básico molecular (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles.

Nº de átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo
6	C6	Fenoles Simples Benzoquinonas
7	C6 -C1	Ácidos Fenólicos
8	C6 -C2	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos
9	C6 -C3	Ácidos Cinámicos Fenilpropenos Cumarinas
10	C6-C4	Naftoquinonas
13	C6 -C1-C6	Xantonas
14	C6-C2-C6	Estilbenos Antraquinonas
15	C6-C3-C6	Flavonoides Isoflavonoides
18	(C6-C3)2	Lignanos Neolignanos
30	(C6-C3-C6)2	Bioflavonoides
N 9	(C6-C3)n	Ligninas
N 6	(C6)n	Melaninas Catecólicas
N 15	(C6-C3-C6)n	Taninos Condensados

Entre los principales:

1. Los derivados del ácido gálico (taninos: condensados e hidrolizables)
2. Los flavonoides (catequinas, leucoantocianinas, flavanonas, flavanonoles, flavonas, antocianinas, flavonoles, chalconas, dihidrochalconas, auronas, isoflavonas)

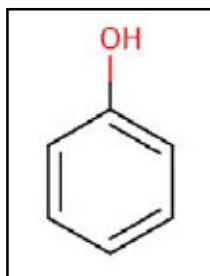


Figura 2. Estructuras de los compuestos fenólicos

Una de las principales funciones de estos compuestos fenólicos es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado³⁴ (Fig. 3).

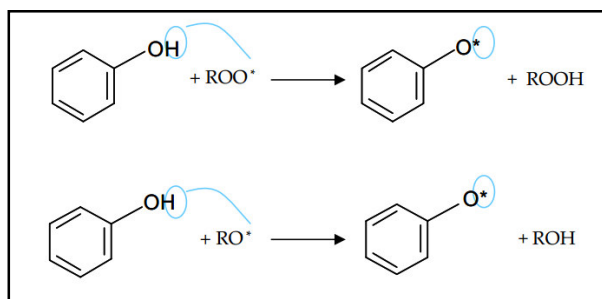


Figura 3. Acción de los compuestos fenólicos frente a los radicales libres

2.3.3. Taninos

A. Generalidades

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina).

Para que una estructura polifenólica se pueda considerar tanino, debe tener un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 mg/kg aproximadamente. Por

debajo o por encima de estos valores, la estructura no se intercala entre las macromoléculas o, si lo hace, no forma estructuras estables.

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios y que tienen la habilidad de formar complejos con proteínas^{35,36}, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas desempeñando en las plantas una acción defensiva frente a los insectos. Son astringentes (precipitan las proteínas) y curten la piel. Debemos mencionar que la astringencia se explica al unirse los taninos con macromoléculas y provocar la precipitación de las glicoproteínas ricas en prolina.

Los taninos se presentan en especies de familias vegetales de todo el mundo, se han identificado aproximadamente 500 especies de plantas que contienen varias cantidades de taninos, entre las principales familias botánicas con importancia en la obtención de taninos se pueden citar a las siguientes: Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae y Myrtaceae³⁷.

Es indudable la importancia que los taninos vegetales han adquirido a través de los años, conforme se ha profundizado su conocimiento y encontrado aplicaciones tan variadas. Quizás la aplicación más antigua es en la industria del cuero, para el proceso del curtido, aprovechando su capacidad de precipitar proteínas; ésta propiedad fue también aplicada en los tejidos vivos, constituyendo la base para su acción terapéutica, empleándolos en medicina, en tratamientos del tracto gastrointestinal y para las excoiaciones y quemaduras de la piel. En este último caso las proteínas forman una capa protectora antiséptica bajo la cual se regeneran los tejidos. También se prescriben como astringentes. Externamente,

los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides, etc. Internamente, son útiles contra la diarrea, enfriamiento intestinal, afecciones vesiculares, y como contraveneno en caso de intoxicación por alcaloides vegetales³⁸.

En los últimos años, en los que ha sido posible el aislamiento y determinación estructural de muchos de estos taninos, ha aumentado la investigación de sus actividades biológicas en base a las diferencias estructurales presentes. Desde el punto de vista biológico los taninos son sustancias complejas producidas por las especies vegetales que cumplen funciones antisépticas o de conservación³⁸.

B. Características

Si bien las propiedades de los taninos dependen fundamentalmente de su constitución química, presentan un cierto número de propiedades comunes que se resumen a continuación^{39,40}.

Son las siguientes:

- La mayor parte son compuestos no cristalizables, de naturalezas coloidales y dotadas de propiedades astringentes.
- Son solubles en agua y alcohol; sus soluciones acuosas tienen carácter ligeramente ácido.
- Precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.
- Forman con las proteínas combinaciones insolubles e imputrescibles, particularidad que es usada en la industria de curtidos.
- Con sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.

- Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.
- Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas. Esta propiedad, denominada astringencia.

C. Actividad terapéutica

Las acciones farmacológicas de los taninos están relacionadas con sus principales propiedades, sobresaliendo su actividad de inhibición enzimática, actividad antioxidante y terapéutica⁴¹.

- Antídotos en intoxicaciones por metales pesados y alcaloides.
- Astringentes, debido a su capacidad para precipitar proteínas de la piel (curtido de la piel), proteínas salivares, etc. Por su propiedad astringente se usa por vía externa como cicatrizantes, tienen efecto vasoconstrictor sobre vasos superficiales pequeñas y por vía interna antidiarreicos.
- Antisépticos, tienen una acción bactericida y bacteriostática. También ejercen un efecto antifúngico.
- Protectores, los taninos aplicados en forma de pomada de uso externo impermeabilizan la piel y la protegen de los agentes externos.
- Antioxidante, son capaces de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica. Inhiben la autooxidación del ácido ascórbico (Vitamina C).
- Disminuye la permeabilidad y fragilidad capilar.
- Hipocolesterolémicos, disminuyen los niveles de colesterol en sangre y aumentan su metabolismo.
- Aumentan el tono muscular y estabilizan el colágeno (inhiben a la elastasa).

- Antinutrientes, ciertos taninos disminuyen la eficacia de los alimentos porque inhiben las enzimas endógenas o porque se absorben y ejercen un efecto sistémico de precipitación de las proteínas de la dieta⁴².
- Inhibidores enzimáticos: de la 5-lipooxigenasa, de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina), protein kinasa C.

La mayoría de las propiedades biológicas de los taninos se debe al poder de formar complejos con macromoléculas, especialmente con proteínas (enzimas digestivas y otras proteínas fúngicas o virales).

Formación reversible de complejos: En condiciones no oxidantes y a pH fisiológico, la formación de complejos –por enlaces hidrógenos y por interacciones hidrófobas- es reversible. El mecanismo de su formación parece ser un fenómeno de superficie, no específico. Los taninos forman una capa menos hidrófoba que la misma proteína en la superficie de esta, lo que ocasiona la precipitación; establecen además (en disolución proteínas condensada) enlaces entre las moléculas proteicas. La afinidad de los taninos por la proteínas es tanto más marcada cuando más flexible sea su conformación y mayor su riqueza en prolina (proteínas salivares, colágeno). Esta afinidad depende estrechamente de la masa molecular.

La formación del enlace bifenílicos (HHDP) disminuye con la movilidad conformacional de la molécula, lo que reduce su afinidad por la proteínas.

Formación irreversible de complejos: Teniendo en cuenta su marcada tendencia a la autooxidación, los taninos son polifenoles originan o-quinonas que,

reaccionan con los grupos nucleofílicos de las proteínas, formando enlaces covalentes.

Actividades terapéuticas debidas a la astringencia: Las aplicaciones de las drogas con taninos son bastantes restringidas y derivan de su afinidad por las moléculas proteicas. Por vía tópica, impermeabiliza las capas más externas de la piel y mucosas, protegiendo así las subyacentes; tienen también un efecto vasoconstrictor sobre pequeños vasos superficiales. Al limitar la perdida de fluidos e impedir las agresiones externas, los taninos favorecen la regeneración de los tejidos en caso de heridas superficiales o de quemaduras. Por vía interna, ejercen un cierto efecto antidiarreico. Sea cual sea la vía de administración, el efecto antiséptico – antibacteriano y antifúngico- demostrado claramente por estas moléculas es interesante.

Inhibición enzimática: Los taninos son inhibidores enzimáticos: bloqueo de la 5-lipoxigenasa (geraniína, corilagina); inhibe la enzima convertidor de angiotensina, activan la hialuronidasa, las glucosiltransferasa de los microorganismos implicados en la cariogénesis; la sanguína H-6 o el ácido chebulágico inhiben las topoisomerasas; los taninos elágicos y los taninos complejos inhiben la protein-kinasa C, etc.

D. Clasificación

En los vegetales superiores se distinguen, generalmente, dos grupos diferentes de taninos tanto por su estructura como por su origen biogenética: taninos hidrolizables y taninos condensados.

Ambos tipos de taninos, al ser compuestos polifenólicos, han sido tema de múltiples revisiones científicas, destacando su propiedad antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, los taninos hidrolizables, aunque se encuentran distribuidos ampliamente en plantas y son un parámetro muy importante de calidad de frutos, han recibido menos atención en lo que se refiere a su impacto a la salud. Esto posiblemente es debido a las dificultades en su identificación, aislamiento, purificación y cuantificación^{43,44}. Debido a esto, es más fácil encontrar referencias que señalan mayor actividad biológica para los taninos condensados⁴⁵.

➤ Taninos hidrolizables o pirogálicos

Los taninos hidrolizables son ésteres, habitualmente formados por una molécula de azúcar (en general glucosa), unidos a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico o su dímero, el ácido elágico). Se forman por derivación de la ruta del ácido shikímico que conduce a la producción del ácido gálico. La estructura más simple de este grupo es pentagaloil-glucosa (Fig. 4).

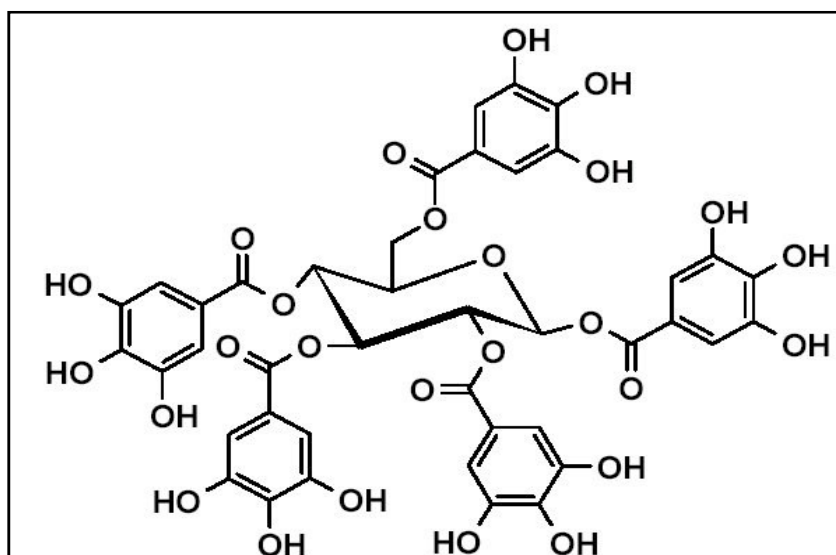


Figura 4. B-1, 2, 3, 4,6-pentagalloyl-D-glucose (*Fuente: Biochemistry and Biophysics*)

Los taninos hidrolizables son característicos de dicotiledóneas. Cuando se destilan en seco producen pirogalolol. Al tratar los taninos hidrolizables con cloruro férrico (FeCl_3) aparece una coloración azul^{36,41,46,47}.

El más estudiado es pentagaloil glucosa (PGG), al que se le reconoce cierta actividad anticancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales *in vitro*. La actividad anticancerígena *in vivo* de la PGG se ha probado para cáncer de próstata y pulmón, no solo impide el crecimiento de tumores, sino también disminuye su tamaño, impidiendo procesos de angiogénesis (crecimiento vascular muy común en metástasis⁴⁸, y la supresión de la expresión de oncoproteínas⁴⁹). Otros estudios exhiben a estos taninos con actividad antitumoral contra sarcomas⁵⁰.

El efecto antidiabético fue probado con una variedad α PGG en adipocitos, donde se observó que el tanino tenía un efecto muy similar al de la insulina, puesto que

se unía a los receptores específicos de insulina de la membrana celular, favoreciendo el transporte de la glucosa al interior de la célula, aún en ausencia de esta hormona. Este resultado fue comprobado *in vivo* en ratones diabéticos y obesos, donde la administración de la misma PGG, provocó mayor resistencia a la glucosa y bajos niveles en sangre.

En cuanto a su actividad como antioxidante, la PGG fue capaz de neutralizar *in vitro* especies altamente reactivas, como el superóxido y radical hidróxilo, así como disminuir la peroxidación de lípidos de membranas celulares⁴⁸.

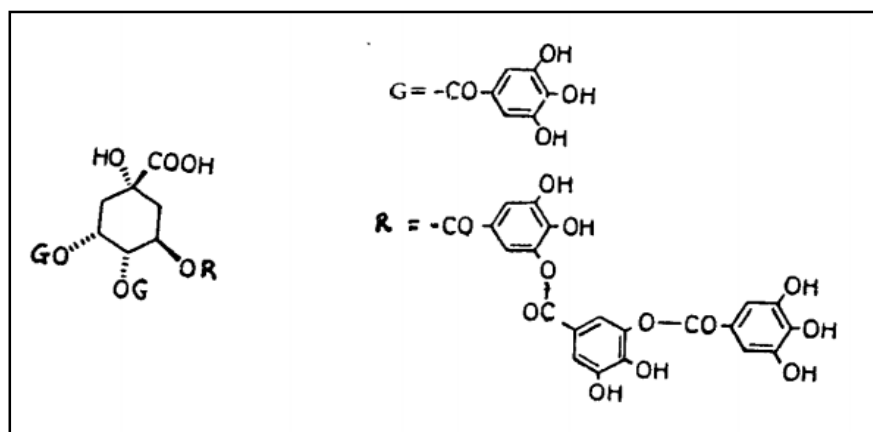


Figura 5. Tanino de tara⁵¹

Hidrólisis de los taninos hidrolizables Los polifenoles vegetales se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas; en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de ácido que produce por la reacción se subdividen en: galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico o dilactona estable del ácido hexahidroxidifénico) Los núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno^{46,47} (Fig. 6 y 7).

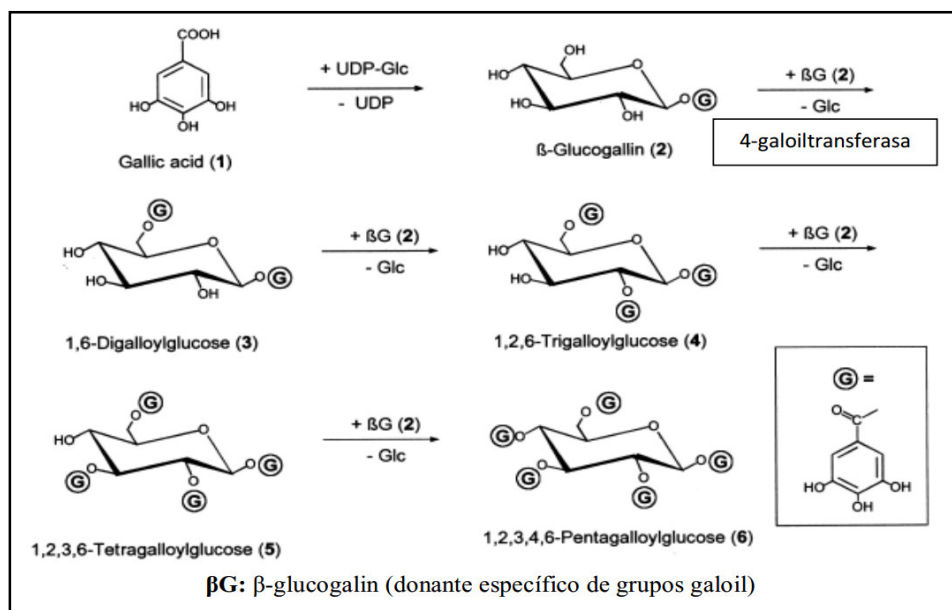


Figura 6. Biosíntesis de galotaninos – detalle del proceso (Fuente: Isaza J. Taninos o Polifenoles)

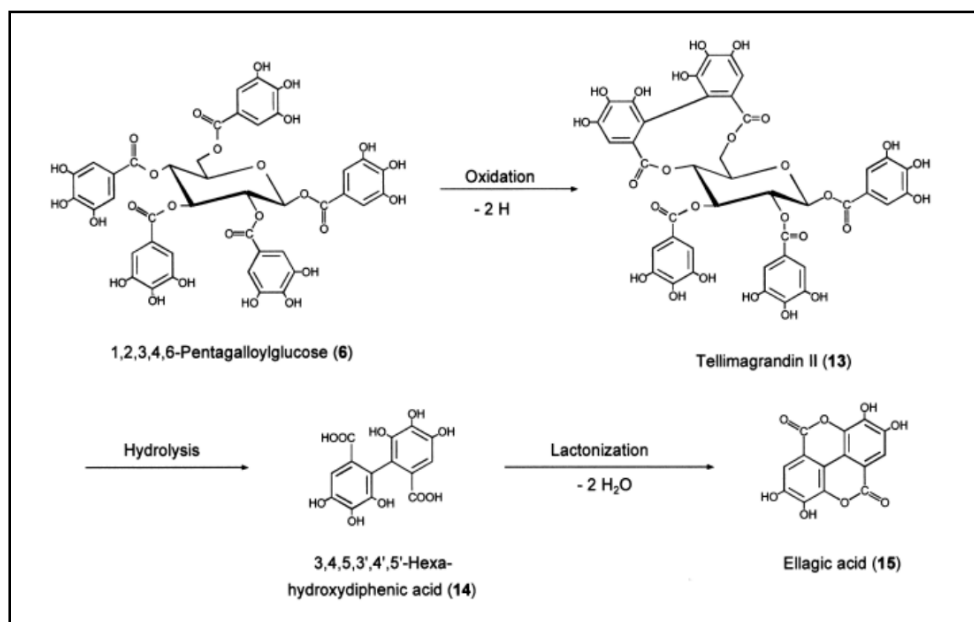


Figura 7. Biosíntesis de elagitaninos – detalle del proceso (Fuente: Review: Ellagitannins: Biosynthesis, biodegradation and biological properties)

A su vez, por hidrólisis de los taninos gálicos (ácido digálico y/o trigálico) se origina el monosacárido y varias unidades de ácido gálico.

Como ejemplos de taninos hidrolizables del subgrupo de galotaninos se menciona al que se obtiene de los frutos de *C. spinosa*. Este tanino es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa. Esto permitió asignar la estructura de ester poligaloilo del ácido quínico a dicho tanino, con un peso molecular aproximado de 800².

➤ Taninos Condensados

Los taninos condensados conocidos genéricamente como poliflavonoides o proantocianidinas están constituidos por flavonoides con diferentes grados de condensación (flavan-3-ol y flavan-3,4-diol) así como otros flavonoides análogos, carbohidratos y trazas de amino e imino ácidos⁵². La estructura básica de los taninos se presenta en la figura 8.

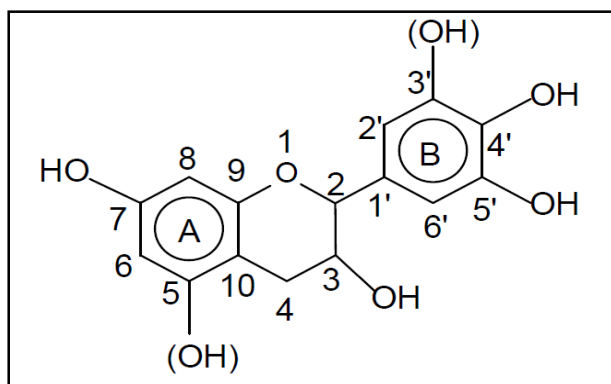


Figura 8. Estructura básica de los taninos condensados.

Derivan de una biosíntesis mixta: la vía del ácido shikímico y la del acetato, en la que produce los flavan-3,4-dioles que luego se polimerizan por condensación en catequina y la leucocianidina, quienes cumplen con el rol de especies precursoras (Fig.9). Las estructuras básicas que componen los taninos están unidas unas con otras mediante enlaces C4-C6 y C4-C8⁵³.

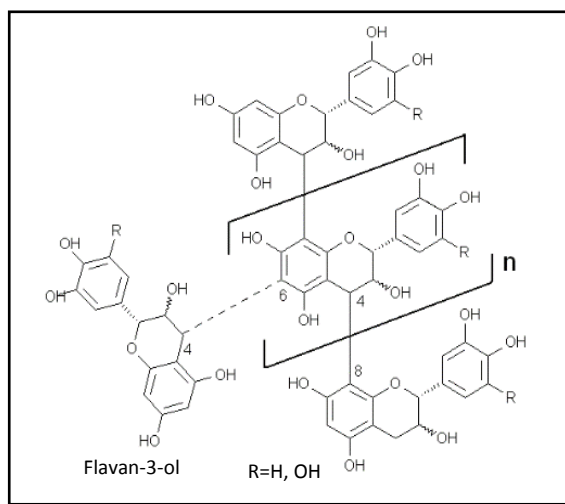


Figura 9. Unidad básica de repetición y estructura de un Tanino Condensado

Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacterial o bacteriostático⁵⁴, anticarcinogénica⁵⁵, inhibidora de la peroxidación lipídica, y de la agregación plaquetaria relacionada a la formación de trombos en sistema circulatorio⁵⁶.

El estudio de la actividad antioxidante de taninos condensados *in vitro* e *in vivo*, demuestra que son secuestradores efectivos de radicales libres, que inhiben la oxidación de tejidos mejor que la vitamina C, vitamina E y β caroteno. *In vitro*, se ha demostrado que los taninos condensados tienen una preferencia por neutralizar el radical libre hidroxilo (\bullet OH). Así mismo, se demostró que tienen la capacidad de actuar como inhibidores no competitivos de la enzima xantina oxidasa, una de las mayores generadoras de radicales libres en el metabolismo celular⁵⁶.

Por último, la actividad antioxidante de taninos condensados tiene la capacidad de evitar la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por ello inhibe la formación de trombosis en personas con padecimientos cardiacos como la

aterosclerosis. No cabe duda de la actividad antioxidante que taninos condensados exhiben *in vivo* e *in vitro*, de tal manera que se podría considerar recomendable incluir un buen aporte de estos taninos en la dieta para gozar de los beneficios a la salud que van relacionados con su capacidad antioxidante. Algunos de estos beneficios pueden ser la inhibición de la oxidación lipídica, así como su efecto anti carcinogénico, que va muy ligado a prevenir daños al ADN causados por radicales libres, y el posterior desarrollo de células mutantes o cancerígenas^{54,55,56}.

Además de encontrarse en dicotiledóneas se producen en helechos y gimnospermas. Son muy resistentes a la hidrólisis. Solo resultan afectados por hidrólisis ácida o enzimática y se convierten en antocianidinas, los cuales pueden polimerizar para formar los flobafenos insolubles. Por destilación seca se producen catecol (1,2-dihidroxibenceno). Por este motivo, reciben también el nombre de taninos catequices. Al tratar los taninos condensados con cloruro férrico (FeCl_3) aparece una coloración verde^{36,41}. Los taninos condensados se encuentran en tres formas principales extraíbles: reactivos con proteína, ligados a proteína, y ligados a fibra. Existen leguminosas donde todos los taninos son extraíbles (e.g. *Acaciaboliviana*) y en otras donde todos son ligados (e.g. *Gliricidia sepium*)^{46,46}.

2.3.4. Flavonoides

A. Generalidades

Los flavonoides están ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores y se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores, sobre todo, en partes

aéreas: hojas, flores y frutos. Algunos flavonoides son responsables del color amarillo de ciertas flores⁴².

B. Estructura química

Todos los flavonoides se originan por ruta biosintética mixta a través de la vía del ácido shikímico (Fig. 10) y la de los policétidos. Se sintetizan a partir de flavononas derivadas a su vez de chalconas provenientes de la vía fenilpropanoide. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y también de unidades de acetato^{57,58,59,60}.

La ruta del ácido shikímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

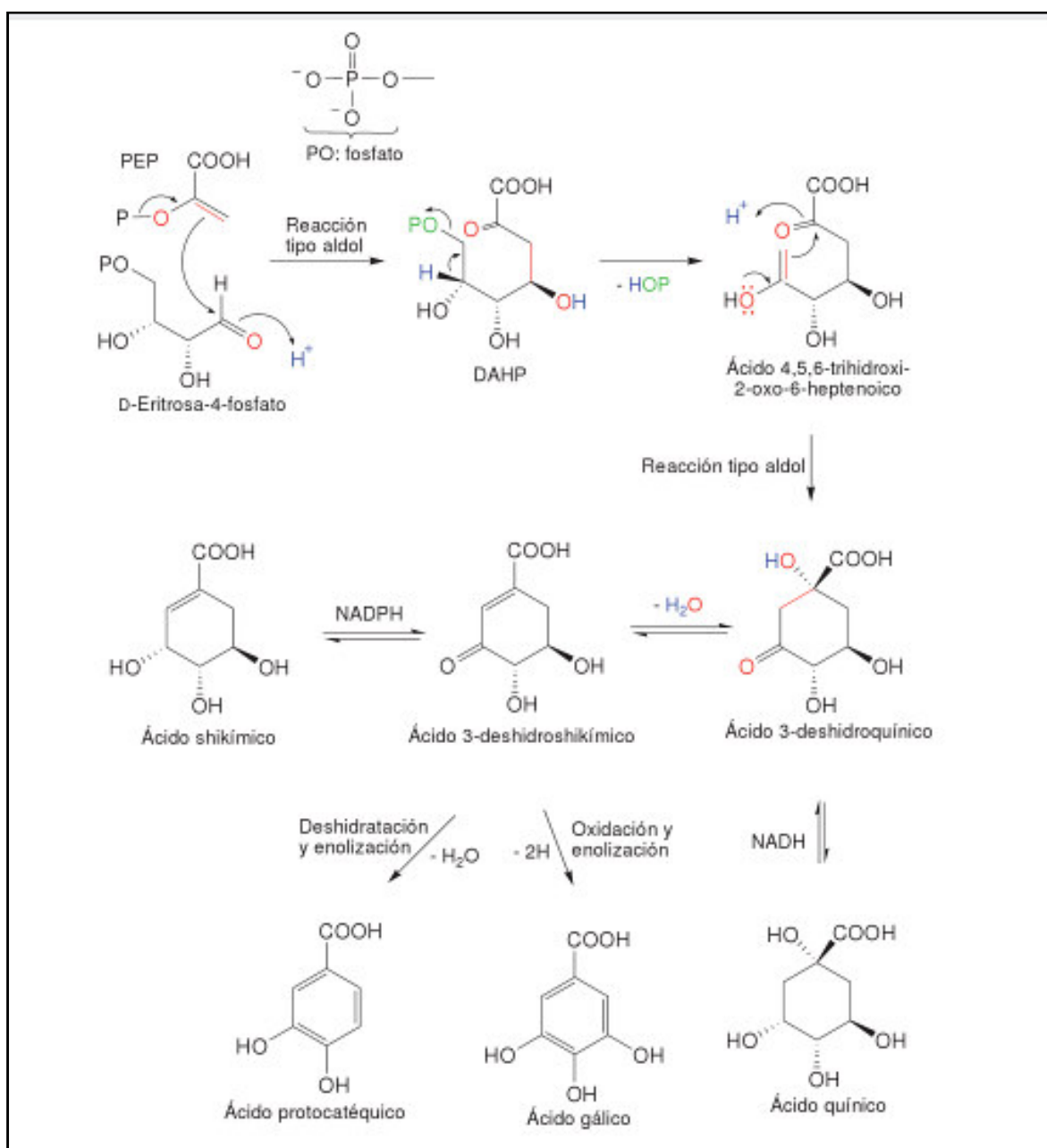


Figura 10. Biosíntesis del ácido shikímico y algunos ácidos aromáticos sencillos (*Fuente: Medicinal Natural Products –A Biosynthetic Approach*)

La ruta del ácido shikímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fosfato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido shikímico, del que

derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido shikímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido transcinámico se transforma en ácido r-cumárico por incorporación de un grupo hidróxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal¹⁵⁰.

La ruta de los poliacetatos se inicia de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides (fig. 11).

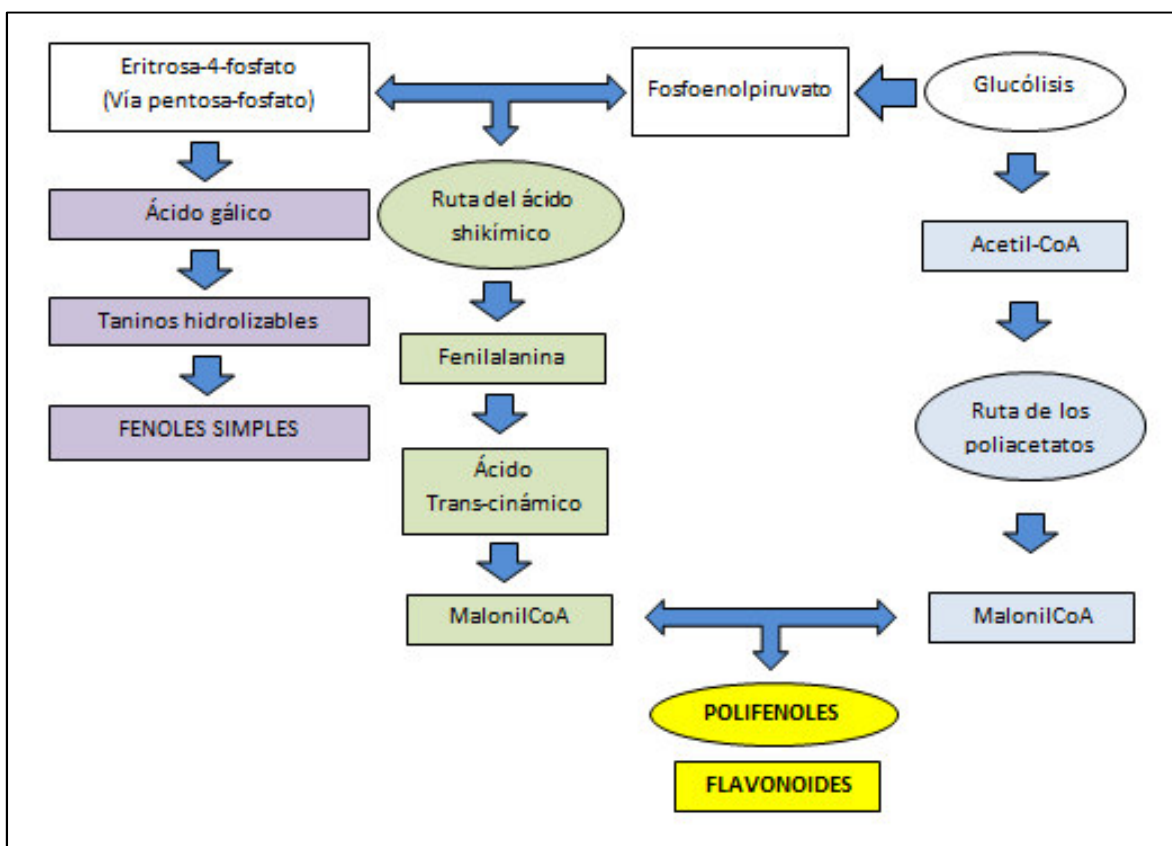


Figura 11. Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas. (CoA: Coenzima A.) *(Fuente: Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular)*

Químicamente, son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Fig. 12)³³. Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (o benzo- γ -pirona) con un fenilo en posición 2. Así pues, son 2-fenil- γ -cromonas. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el B y la unidad C, proceden de la ruta del ácido shikímico^{58,59}.

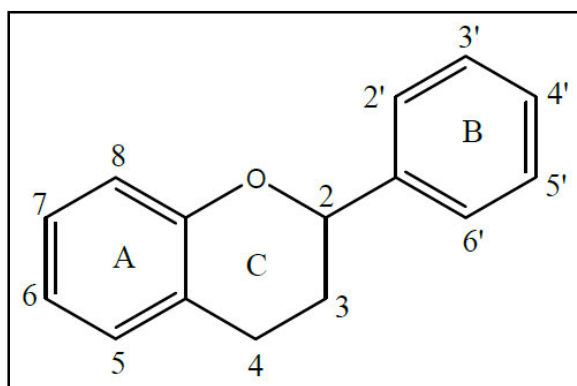


Figura 12. Estructura básica de los flavonoides (fenilbenzopirano)

Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y, por tanto, son polifenólicas. Poseen un carbonilo en posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B.

C. Clasificación

Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Al modificar el esqueleto común de los flavonoides por glicosilación, oxidación, reducción o alquilación, el núcleo fenilpropanoide genera un escaso número de estructuras básicas de las cuales se deriva la amplia gama de flavonoides entre los que se incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas, flavanonoles, isoflavonas, chalconas y neoflavonas^{60,61,62} (Fig. 13). Las diferentes clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y la sustitución de grupos en el anillo C, mientras los componentes individuales dentro de una clase difieren en la sustitución en los anillos A y B^{63,64}.

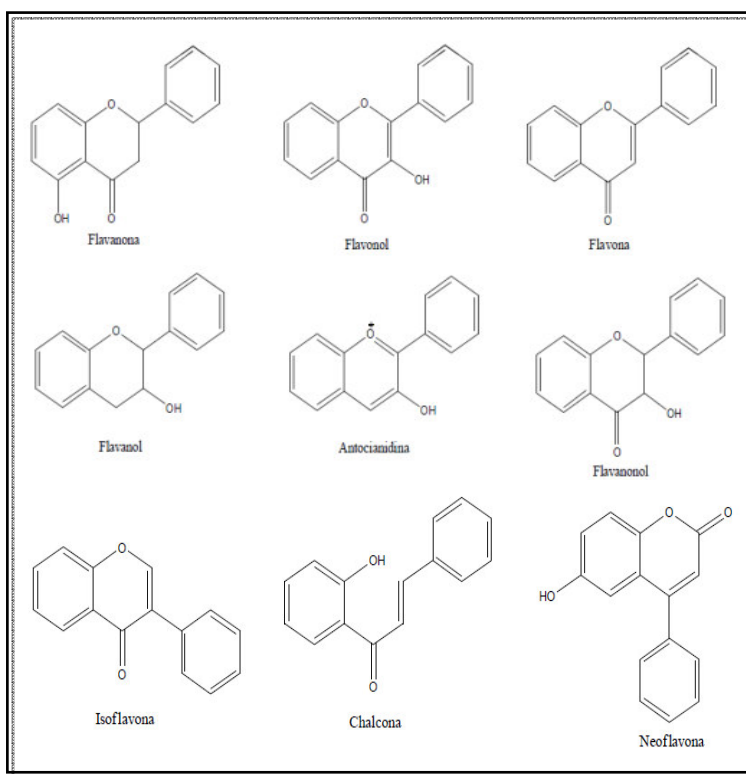


Figura 13. Estructura básica de diversos flavonoides^{33,57,58,59,65}

Tres características estructurales son importantes para su función:

- La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi;
- La presencia de un doble enlace en posición 2, 3;
- La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

D. Características físicas

Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento. Sus heterósidos son solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares, siendo insolubles en los apolares. Sin embargo, cuando están en estado libre, son poco solubles en agua, pero son solubles en disolventes orgánicos más o menos oxigenados, dependiendo de su polaridad. Además, son sustancias que

se oxidan más rápidamente que otro tipo de sustancias, motivo por el cual se consideran como antioxidantes⁶⁶.

E. Propiedades biológicas de los flavonoides

Entre los mecanismos propuestos para explicar los efectos beneficiosos para la salud ejercida por los flavonoides, se encuentran el efecto antioxidante, la quelación de metales, la inhibición enzimática y la regulación génica⁶⁷. Se sabe que los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante en numerosos sistemas biológicos, pero se ha de tener en cuenta que su distribución en estos sistemas depende de su relativa hidrofiliidad/hidrofobicidad y de sus interacciones con determinadas macromoléculas⁶⁸. Estos factores determinan la concentración local de flavonoides, lo que influye en su capacidad para regular ciertos fenómenos celulares. Gran parte del efecto protector ejercido por los flavonoides, por ejemplo de las catequinas presentes en el té, se ha atribuido a su capacidad para neutralizar o secuestrar radicales libres; pero cada vez hay más estudios que evidencian que estos compuestos también actúan regulando ciertas actividades enzimáticas celulares y que, parte de esta regulación, estaría relacionada con la capacidad de los flavonoides para alterar la estructura de la membrana plasmática⁶⁹. Este efecto, permitiría actuar a los flavonoides sobre diversos procesos celulares estrechamente relacionados con la membrana plasmática, como la señalización celular⁷⁰, el ciclo celular, el metabolismo del ácido araquidónico⁵¹, la proliferación celular, la apoptosis y la funcionalidad de las mitocondrias⁷¹.

Clasificación de acuerdo a las actividades farmacológicas de los flavonoides⁴:

1. Vasoprotectores
2. Modificadores de los niveles del colesterol y lípidos
3. Antiagregantes
4. Modificadores enzimáticos
5. Actividad estrogénica
6. Actividad anticancerígena
7. Actividad antibacteriana y antifúngica
8. Actividad antiurémica
9. Actividad espasmolítica
10. Actividad antialérgica
11. Actividad antiinflamatoria
12. Actividad antivírica

En la **Tabla 2**. Se resumen las actividades biológicas asignadas a los flavonoides y algunas de las fuentes donde podemos encontrar estos compuestos.

Tabla 2. Propiedades beneficiosas de los flavonoides.

Compuesto	Efecto metabólico	Fuentes	Referencias
Flavanonas Naringenina Hesperidina Eriocitrina	Protegen la peroxidación Afectan a la permeabilidad de los lípidos Antitumoral Hormonal Antimicrobiano	Cítricos Miel Tomates Menta	Espín y Tomás Barberán, 2005 Tomás Barberán y Clifford, 2000 Cowan, 1999 Katsenis, 2005
Flavonas Luteolina Apigenina	Actividad de fitoestrógenos Antimicrobiano	Pimiento Apio Perejil	Harborne y Williams, 2000 Cowan, 1999
Isoflavonas Daidzeína Genisteína	Antioxidante Actividad estrogénica	Soja Plantas leguminosas	Dijsselbloem y col., 2004 Dixon, 2004
Flavonoles Quercetina Miricetina Kaempferol	Antioxidante Disminuyen la agregación plaquetaria Disminuyen la oxidación de las LDL Antimutagénico Antiinflamatorio Antimicrobiano	Manzana Uva Cereza Granada Cebollas Escarola Té Brócoli	Tomás- Barberán, 2003 Nijveltd y col., 2001 Espín y TomásBarberán, 2005 Cowan, 1999 Harborne y Williams, 2000
Flavanoles Catequinas Proantocianidinas	Antioxidante Antimutagénico Antiinflamatorio Antialérgico Anticancerígeno Antimicrobiana Disminuye la oxidación de las LDL Disminuye la agregación plaquetaria	Uva Manzana Pera Cerezas Granada Té Chocolate	Kris-Etherton y col., 2002 Poyrazoglu y col., 2002 Yokozawa y col., 1998 Ahmad y col., 2000 Fujimura y col., 2002 Kundu y col., 2003
Antocianos Cianidina Pelargonidina	Antioxidante Antitumoral Antiinflamatorio	Cereza Uva Fresa	Mc Dougall y col., 2005 Kong y col., 2003

➤ Propiedades antioxidantes

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno que se generan durante el metabolismo normal del oxígeno o bien son inducidos por factores exógenos⁷², suponen un riesgo potencial para las células y tejidos. Los flavonoides ejercen un efecto protector, ya que forman parte del denominado sistema de defensa antioxidante exógeno del organismo, es decir, aquellas defensas que se adquieren

a través de la dieta. Existen tres tipos de mecanismos que pueden explicar la actividad antioxidante de estas defensas:

1. La transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical activa.
2. La transferencia de electrones que determina la formación de una molécula antioxidante inactiva o estable.
3. Pequeñas moléculas que actúan como enzimas antioxidantes⁷³.

Se cree que el mecanismo por el que los flavonoides ejercen su actividad antioxidante se basa en la transferencia de electrones, que conlleva la aparición de una molécula radical activa y la capacidad de estos compuestos para quelar metales. Pero los flavonoides deben cumplir dos requisitos adicionales para ser considerados moléculas antioxidantes⁷⁴: incluso a bajas concentraciones deben proteger a los compuestos frente a la oxidación o el daño inducido por radicales libres y, el radical flavonoide formado (llamado radical aroxilo), debe ser lo suficientemente estable para que la función antioxidante sea efectiva. El carácter inestable del radical aroxilo puede ocasionar un efecto prooxidante mostrado por algunos flavonoides, sin embargo la colaboración entre moléculas antioxidantes, favorece la recuperación del radical aroxilo por otros antioxidantes, como el ascorbato. Los flavonoides presentan mayor o menor capacidad antioxidante en función del número y posición de sus grupos hidroxilo unidos a las estructuras de anillo⁷⁵. Los compuestos de naturaleza flavonoide presentan una serie de características estructurales que permiten valorar, *a priori*, su posible función antioxidante:

- i) Presencia de grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) en el anillo B;
- ii) Presencia de doble enlace insaturado entre C2 y C3 en el anillo C y;
- iii) Presencia de grupo hidroxilo en C3 en el anillo C^{73,76}. También es importante la presencia de grupos funcionales, capaces de unir iones de metales de transición como el hierro o el cobre. El ejemplo de compuesto flavonoide que reúne las propiedades químicas descritas es el flavonol quercetina⁷⁷ (Fig. 14).

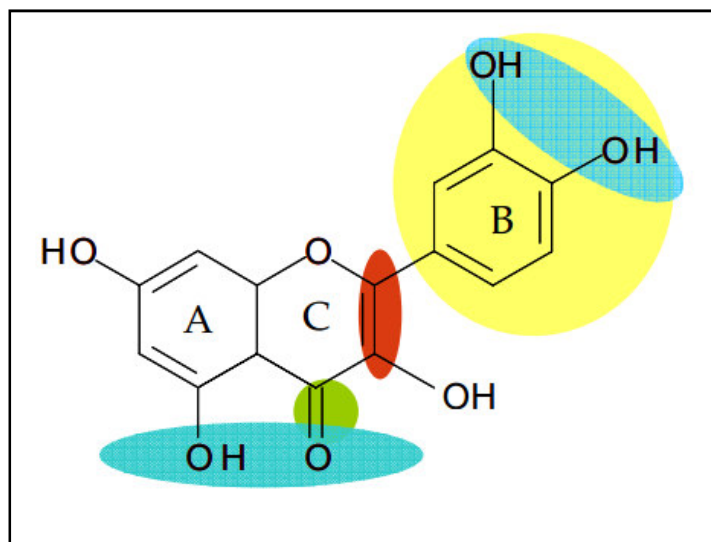


Figura 14. Estructura de quercetina, resaltando los grupos implicados en su actividad antioxidante. En amarillo, el grupo catecol del anillo B; en rojo, enlace insaturado del anillo C; en verde, función 4-oxo en el anillo C; en azul, puntos con capacidad de quelación de metales.

Quercetina presenta una actividad antioxidante cinco veces mayor que la determinada para las vitaminas C y E, además de poseer una hidrosolubilidad similar a esta última. Exhibe un efecto sinérgico con estas vitaminas, ya que el ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera que combinado

con ella permite al flavonoide mantener sus propiedades durante más tiempo. Por su parte, se ha descrito que quercetina protege de la oxidación a la vitamina E⁷⁵.

A la hora de valorar el poder antioxidante de los flavonoides, también debe tenerse en cuenta la presencia de grupos galato. Numerosos estudios demuestran que muchas de las actividades biológicas de las catequinas del té, se relacionan con la presencia de grupos pirogalol y ácido gálico en su estructura (Fig. 15), que le confiere a la planta mayor capacidad antibacteriana^{78,79}, y favorece su actividad antioxidante actuando como secuestrante de radicales libres⁶⁹.

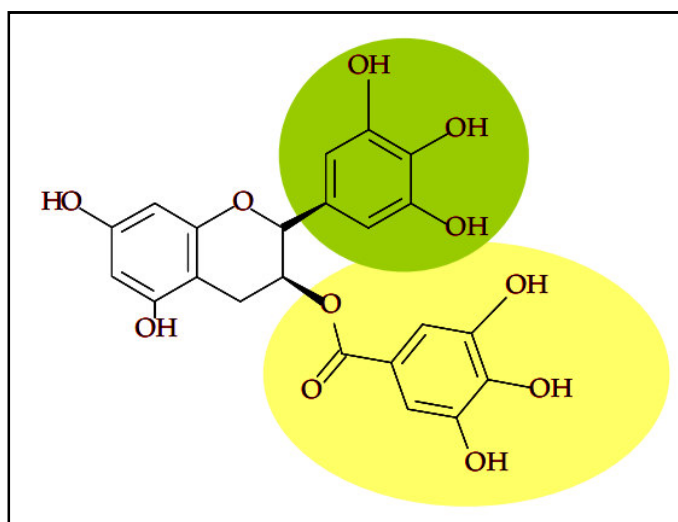


Figura 15. Grupo galato presente en la molécula epigalocatequina galato (EGCG). En verde, grupo pirogalol; en amarillo, grupo galato.

Los fenoles con una estructura catecol en el anillo B, a pesar de tener mayor potencial antioxidante, son metabolizados con mayor facilidad. Para entender el potencial que tienen los flavonoides para actuar como antioxidantes *in vivo*, es necesario tener en cuenta otros factores como la biodisponibilidad e interacciones en el tracto gastrointestinal, así como la influencia de la conjugación y el metabolismo⁸⁰.

También actúan inhibiendo sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad vascular como: la catecol O-metil transferasa (COMT), con lo que aumentan la duración de la acción de las catecolaminas, incidiendo por tanto en la resistencia vascular. Muchos de ellos favorecen los procesos de hidroxilación de prolina y lisina de las fibras de colágeno y fibras elásticas, inhibiendo además a la hialuronidasa, por lo que actúan como protectores de la sustancia fundamental; las fosfodiesterasas, por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria. Los antocianósidos, especialmente, producen además un aumento de la regeneración de la purpura retiniana y de la rodopsina, mejorando la visión crepuscular⁸¹.

➤ **Propiedad antiinflamatoria:**

La acción antiinflamatoria que poseen muchos flavonoides se relaciona en parte con su interacción con diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico. *In vitro*, los flavonoides polihidroxilados actúan preferentemente por la vía de 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidróxilados inhiben fundamentalmente la vía de ciclooxigenasa. *In vivo*, sin embargo, parecen comportarse como inhibidores duales. Esta diferencia de comportamiento, no exclusiva de flavonoides, se debe a la biotransformación que sufren en el organismo. Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria y en los cuales pueden intervenir los flavonoides son:

- Inhibición de la liberación de histamina, mediante la histidina decarboxilasa.
- Inhibición de la migración celular, en el proceso inflamatorio los leucocitos se dirigen por quimiotactismo hacia el foco inflamatorio, donde son activados liberando eicosanoides y otros agentes proinflamatorios.

- Acción antirradicalaria (actuando frente a los radicales libres que se originan en la inflamación)

Algunos flavonoides (por ejemplo, hipoleitin-8-glucosido) combinan las acciones antiinflamatoria y antiulcerosa, lo que supone una buena alternativa a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Por otro lado, los flavonoides ejercen otras acciones: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica, reduciendo el índice de ulceración y la intensidad del daño mucosal, mediado por distintos mecanismos: gastroprotector y antisecretor^{82,83}.

2.4. Actividad biológica

2.4.1. Actividad antiinflamatoria

A. Inflamación

La inflamación es una respuesta esencial en la supervivencia de los organismos multicelulares frente a la agresión, consiste básicamente en una respuesta de los vasos sanguíneos y de los leucocitos. La lesión tisular que desencadena esta respuesta puede ser causada por un agente físico, químico o biológico. La respuesta inflamatoria es fundamental para inducir una respuesta inmune específica que sea adecuada y finalmente para iniciar el proceso de reparación de los tejidos lesionados. La reparación inicia durante las fases iniciales de la inflamación, aunque no finaliza hasta que se ha neutralizado el estímulo lesivo. Durante la reparación, el tejido lesionado es substituido por nuevo tejido (cicatrización). Tras un proceso inflamatorio puede ocurrir lo siguiente⁸⁴:

1. Resolución con retorno a una estructura y función normal.

2. Supuración con formación de absceso.
3. Hinchazón con regeneración de tejido especializado o fibroso formando una cicatriz.
4. Persistencia de agentes causantes, haciéndose un proceso crónico.

B. Tipos de inflamación: La respuesta inflamatoria presenta dos tipos, que se diferencian por su duración:

- **Inflamación aguda** : Es la respuesta inicial e inmediata a la lesión, relacionada principalmente con cambios hemodinámicos locales que llevan a manifestaciones clínicas como rubor, calor, edema y dolor en la zona afectada. Posteriormente, hay salida de leucocitos hacia el tejido lesionado e iniciar el proceso de degradación de los tejidos necróticos. Este tipo de inflamación tiene una duración que oscila entre, minutos, horas y pocos días.

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

1. Cambios en el flujo y calibre vascular, que hacen que aumente el flujo sanguíneo.
2. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio.
3. Paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.
4. El resultado de todo ello es el acúmulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. En los primeros 10 – 15 minutos se produce una hiperemia por dilatación de arteriolas y vénulas y apertura de los vasos de pequeño

calibre. Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta, y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio.

- **Inflamación crónica:** Es una inflamación de larga duración (semanas, meses o años) en la cual la inflamación activa, la lesión tisular y el proceso de reparación suceden al mismo tiempo. La inflamación crónica es nociva para la salud y se constituye en el mecanismo patogénico básico de algunas enfermedades crónicas como artritis reumatoidea, aterosclerosis fibrosis pulmonar, obesidad, entre otras⁸⁵.

C. Fases de la inflamación

Después de un corto periodo de vasoconstricción a nivel arterial, se produce vasodilatación y aumento de flujo sanguíneo en la zona de la lesión, que causa enrojecimiento y aumento de la temperatura; posteriormente el flujo sanguíneo disminuye por un aumento de la permeabilidad vascular que permite la salida de líquido de los vasos y aumento de la viscosidad sanguínea, lo que se denomina estasis (parálisis total del flujo). A medida que evoluciona la estasis, se produce la migración de los leucocitos a través del endotelio vascular mediante un mecanismo denominado trans migración (Fig. 16), el cual permite que las células inflamatorias lleguen al sitio de la lesión.

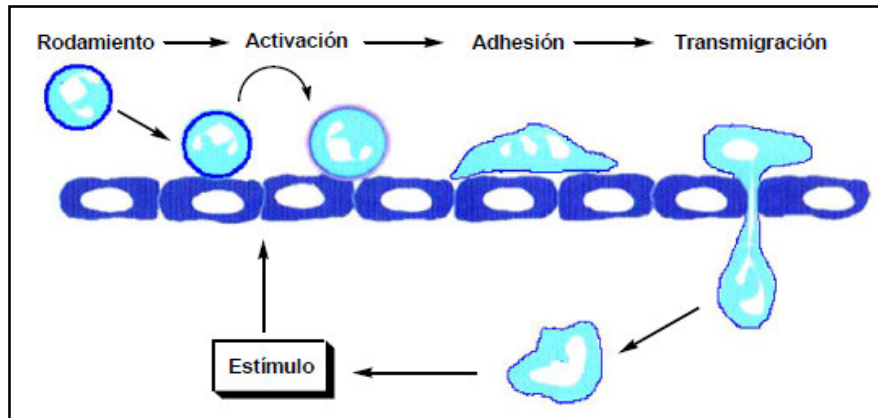


Figura 16. Migración de leucocitos al tejido lesionado durante la respuesta inflamatoria
(Fuente: *Curso Actualizaciones en Dolor e Inflamación en Reumatología*)

D. Mediadores de la inflamación

La activación de los mastocitos, basófilos y plaquetas estimula el metabolismo del ácido araquidónico con la consiguiente síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. La histamina y la serotonina, segregadas por mastocitos, basófilos y plaquetas, producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular. El PAF es un complejo lisofosfolípido-acetilado que induce la segregación plaquetaria y la degranulación. Además, aumenta la permeabilidad vascular, induce la adhesión leucocitaria y estimula la síntesis de derivados del ácido raquidónico. Estos derivados incluyen las prostaglandinas y los leucotrienos.

El ácido araquidónico es un ácido graso derivado del ácido linoleico que se encuentra en la membrana celular y bajo estimulación puede ser liberado al exterior de la célula por una fosfolipasa. El óxido nítrico se produce por las células endoteliales, macrófagos y neuronas del cerebro^{84,86,87}.

E. Reparación de la inflamación

En la inflamación se produce una destrucción de las células del parénquima y de las del estroma. El tejido lesionado es reparado mediante tejido conectivo que va a producir la fibrosis y la esclerosis.

En este proceso intervienen los siguientes componentes:

1. Formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).
2. Migración y proliferación de fibroblasto.
3. Depósito de matriz extracelular.
4. Maduración y organización del tejido fibroso (remodelación)

El proceso de reparación empieza a las 24 horas tras la lesión. Los fibroblastos y las células del endotelio vascular comienzan a proliferar formando el tejido de granulación en el cual se forman nuevos vasos (angiogénesis) ⁸⁴.

E. Metabolitos del ácido araquidónico (AA):

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono que procede de la dieta a partir del ácido linoléico, éste se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana celular y se libera por medio de fosfolipasas celulares que se activan mediante estímulos proinflamatorios.

Los metabolitos del AA, llamados eicosanoides, son sintetizados por dos vías: la vía de la ciclooxigenasa (generadora de prostaglandinas y tromboxanos) y la vía de la lipooxigenasa (generadora de leucotrienos y lipoxinas) (Fig. 17). Las prostaglandinas y los tromboxanos son responsables de la vasodilatación, generación del dolor y fiebre. También está la vía de la lipoxigenasa que genera leucotrienos (que participan en el incremento de la permeabilidad vascular,

quimiotaxis, activación y adhesión de leucocitos) y las lipoxinas, que inhiben la adhesión de neutrófilos y quimiotaxis⁸⁶.

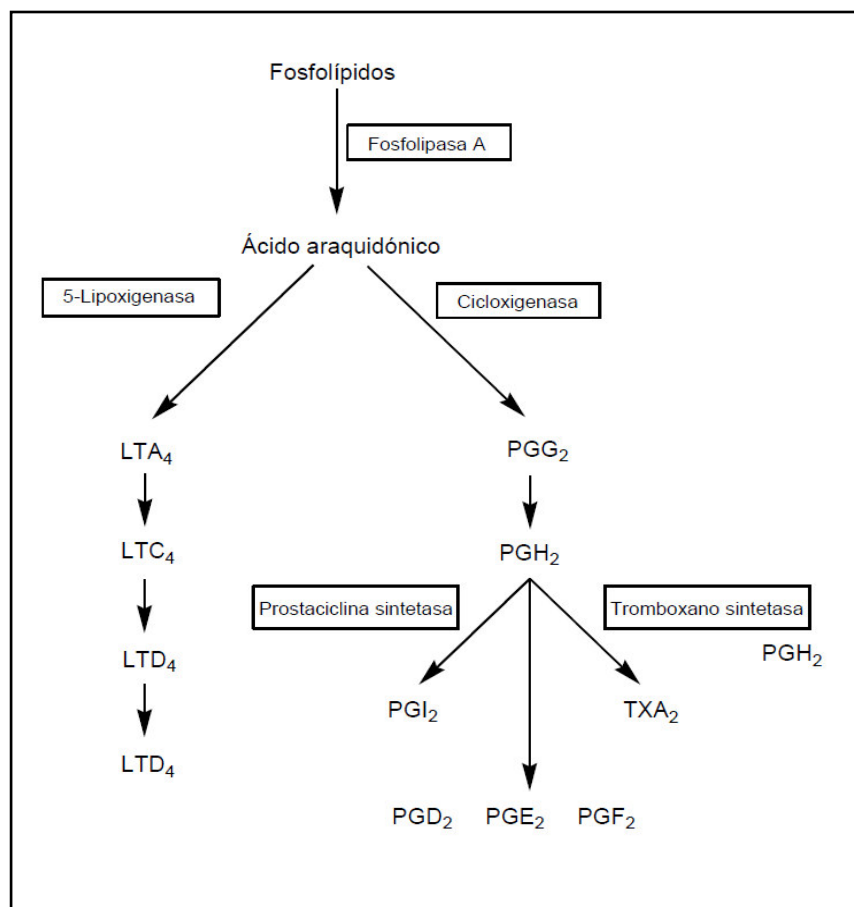


Figura 17. Biosíntesis del ácido araquidónico y sus metabolitos.

La prostaglandina E2 (PGE2) (Fig. 18) induce vasodilatación y actúa sinérgicamente con otros mediadores como la histamina y las bradiquininas para incrementar la permeabilidad vascular durante la respuesta inflamatoria y generar edema. Adicionalmente, la PGE2 es un mediador central de la respuesta febril inducida durante el proceso inflamatorio.

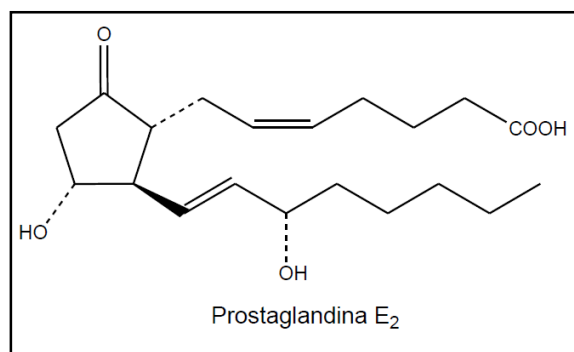


Figura 18. Prostaglandina E₂.

E. Rol de las especies reactivas en la inflamación

En la inflamación existe una generación excesiva de radicales libres, provenientes de diferentes fuentes, las cuales a su vez participan activamente en la evolución del proceso inflamatorio y sus consecuencias. Los metabolitos reactivos del oxígeno elaborados en los neutrófilos y macrófagos pueden ser liberados tras la exposición a los agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o ante la fagocitosis⁸⁸. Por ejemplo, cuando la NADPH oxidasa que reside en las células mono y PMN se activa, genera especies reactivas del oxígeno (ROS). Además del rol defensivo de las ROS como microbicidas, éstas son el estímulo más potente que incrementa la permeabilidad vascular, la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-8, IL-1 β) que a su vez estimulan más producción de ROS, de factores quimiotácticos (LB4), activan las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial, inactivan antiproteasas como la α -1-antitripsina lo cual incrementa la destrucción de los componentes tisulares como la elastina, provocan peroxidación lipídica en las membranas plasmáticas y oxidación del DNA. De esta forma, las ROS desregulan las funciones celulares e inducen daño tisular, lo cual incrementa en estado de inflamación⁸⁹.

Las ROS promueven la actividad de los factores proinflamatorios nucleares sensibles a cambios redox, incluyendo el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB)⁸⁹. Este a su vez aumenta la expresión del gen codificante de la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS), que promueve la síntesis de óxido nítrico (NO, gas considerado un radical libre) por las células endoteliales, lo cual determina la vasodilatación. El NO tiene una acción corta y local. También es producida por los macrófagos, ya que las interleucinas activan las sintasas del NO; cuando éstas se liberan en cantidades incontroladas, se produce vasodilatación periférica y necrosis tisular⁶⁶.

F. Fármacos antiinflamatorios

La inflamación aguda o fisiológica es una respuesta benéfica al daño tisular, pero cuando se retrasa su resolución oportuna, puede dar lugar a enfermedades inmunoasociadas, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), cáncer, entre otras⁹⁰, todas directa o indirectamente, a través de la introducción de las células inflamatorias en el estroma circundante.

Por ello la industria farmacéutica ha creado fármacos que disminuyen el proceso inflamatorio, las dos clases más importantes de agentes farmacológicos que inhiben la respuesta inflamatoria aguda, subaguda o crónica son:

1. Fármacos antiinflamatorios esteroides o corticoesteroides (hormonas glucocorticoideas suprarrenales, AIE), cuyo prototipo es la hidrocortisona.
2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuyo prototipo es la aspirina^{91,92}.

G. Biodisponibilidad de polifenoles en las plantas

La definición de biodisponibilidad más comúnmente aceptada hace referencia a “la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación”⁹³. Es importante conocer la cantidad total de polifenoles que está presente en un alimento o ingrediente alimentario, pero, teniendo en cuenta la definición anterior de biodisponibilidad, es más importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento.

El concepto de biodisponibilidad cobra una gran importancia, dado que los polifenoles más abundantes no siempre son los más activos en el organismo, ya sea porque tienen una menor actividad intrínseca, su absorción en el intestino es baja, son altamente metabolizados o se excretan rápidamente. En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones comunes para todos ellos, que es similar a la decodificación metabólica que sufren muchos xenobióticos para reducir su potencial efecto citotóxico, incrementar su hidrofiliidad y facilitar su eliminación urinaria o biliar. La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. En realidad, en los alimentos, prácticamente todos los flavonoides, excepto los flavanoles, presentan formas glucosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría de los glucósidos resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Estas sustancias deben hidrolizarse por

enzimas intestinales como la B-glucosidasa y la lactasa-florizin hidrolasa, o deben ser degradadas por la microflora del colon antes de poder asimilarse⁹⁴.

Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren, por tanto, diversas modificaciones. De hecho, estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación en el hígado. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, y esto dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica. Los principales objetivos de los estudios de biodisponibilidad son: determinar cuáles son los polifenoles que mejor se absorben, valorar que polifenoles dan lugar a metabolitos activos, y caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos. La estructura química de los polifenoles, más que su concentración, determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma. La glucosilación afecta al grado de absorción de estos compuestos, y los polifenoles más comunes de nuestra dieta, no son necesariamente los que producen una mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana⁹⁵.

Para estudiar indirectamente la biodisponibilidad de los polifenoles se puede evaluar el incremento de la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de alimentos ricos en estos compuestos. Para realizar estudios directos de biodisponibilidad, se mide la concentración del compuesto en el plasma y en la orina tras la ingestión de alimentos con cantidades conocidas, de los polifenoles

en análisis⁹⁶. Uno de los polifenoles más estudiados es la quercetina. Estudios experimentales en ratas, han demostrado que la quercetina puede absorberse a nivel gástrico, pero sus glucósidos no se absorben a este nivel. La glucosilación de la quercetina facilita, sin embargo, su absorción a nivel intestinal. Allí los glucósidos de quercetina se absorben mejor que su propia aglicona.

Se ha sugerido que los glucósidos pueden ser transportados al interior del enterocito, por un transportador de glucosa dependiente de sodio y el glucósido se hidrolizaría después por una glucosidasa citosólica. El metabolismo de la quercetina en humanos se ha caracterizado extensamente. En muestras de plasma de voluntarios que recibieron quercetina por vía oral, se encontraron formas conjugadas de quercetina distintas a las administradas.

Sabemos, por tanto, que una vez absorbidos, los polifenoles están sujetos a procesos de detoxificación metabólica, que incluyen distintas modificaciones como metilación, sulfatación y glucuronidación. Estos procesos aumentan la hidrofiliidad del compuesto y facilitan su excreción por vía urinaria o biliar. La frecuencia de estas modificaciones está condicionada por la naturaleza y la dosis de polifenol ingerida. El balance entre sulfatación y glucuronidación de los polifenoles varía en función de la especie y el sexo⁹⁷. Es importante identificar la posición de los grupos conjugados sobre la estructura polifenólica, ya que estas modificaciones pueden afectar a sus propiedades biológicas. Los metabolitos circulantes se pueden unir a proteínas del plasma; principalmente a la albúmina. La afinidad de los polifenoles a la albúmina varía en función de su estructura

química. La capacidad de unión a la albúmina puede determinar la presencia del metabolito en células y tejidos. Sin embargo, esta poco claro si sus efectos biológicos están mediados por la unión a albumina, como se ha demostrado para la quercetina. Un estudio reciente, ha demostrado que la unión de los flavonoides a la albúmina sérica, puede modularse por componentes del plasma. Más concretamente, se ha demostrado la posible participación de los ácidos grasos, en la modulación por inhibición alostérica, en la unión de los flavonoides a la albúmina en humanos, y de alguna forma esta inhibición podría interferir en sus efectos biológicos⁹⁸.

La concentración de polifenoles en el plasma es muy variable; depende principalmente de su estructura química y de su fuente de origen, y es necesario ingerir estos compuestos de forma reiterada a lo largo del tiempo para mantener sus concentraciones elevadas en el plasma. Estudios realizados en humanos han señalado que la concentración de polifenoles en plasma no está directamente relacionada con la concentración de polifenoles en los tejidos. Además, la distribución entre plasma y tejidos difiere para los distintos tipos de polifenoles⁹⁹. Por lo tanto, puede ser incluso más importante determinar la concentración de polifenoles en los tejidos que conocer su concentración en el plasma. Principalmente, los polifenoles se encuentran en tejidos donde se han metabolizado (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico), pero además también pueden acumularse en tejidos diana específicos, como: tejido pulmonar, pancreático, cerebral, cardíaco y tejido esplénico.

Los polifenoles que no se absorben en el intestino delgado alcanzan el colon, y allí la microflora hidroliza glucósidos en agliconas y metaboliza masivamente las agliconas en distintos ácidos aromáticos¹⁰⁰.

H.- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Son los medicamentos más recetados en casi todos los países del mundo. La denominación antiinflamatorios no esteroideos hace referencia, además de su estructura química, su mecanismo de acción independiente del efecto de los esteroides sobre la fosfolipasa A2.

Todos los AINEs tienen una eficacia terapéutica similar y ninguno está exento de reacciones adversas, por lo que en el momento de su prescripción debe considerarse el costo del tratamiento de cada uno de ellos¹⁰¹.

➤ Mecanismo de acción

Los principales efectos terapéuticos de los AINEs provienen de sus capacidad de inhibir la biosíntesis y liberación de prostaglandinas como mediadores de la inflamación (al inhibir con mayor o menor potencia y especificidad, las isoformas de la COX), así como disminuir inespecíficamente la permeabilidad, debido a las prostaglandinas actúan como factores inmediatos de la inflamación y son las responsables del dolor, la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la fiebre (Fig.19).

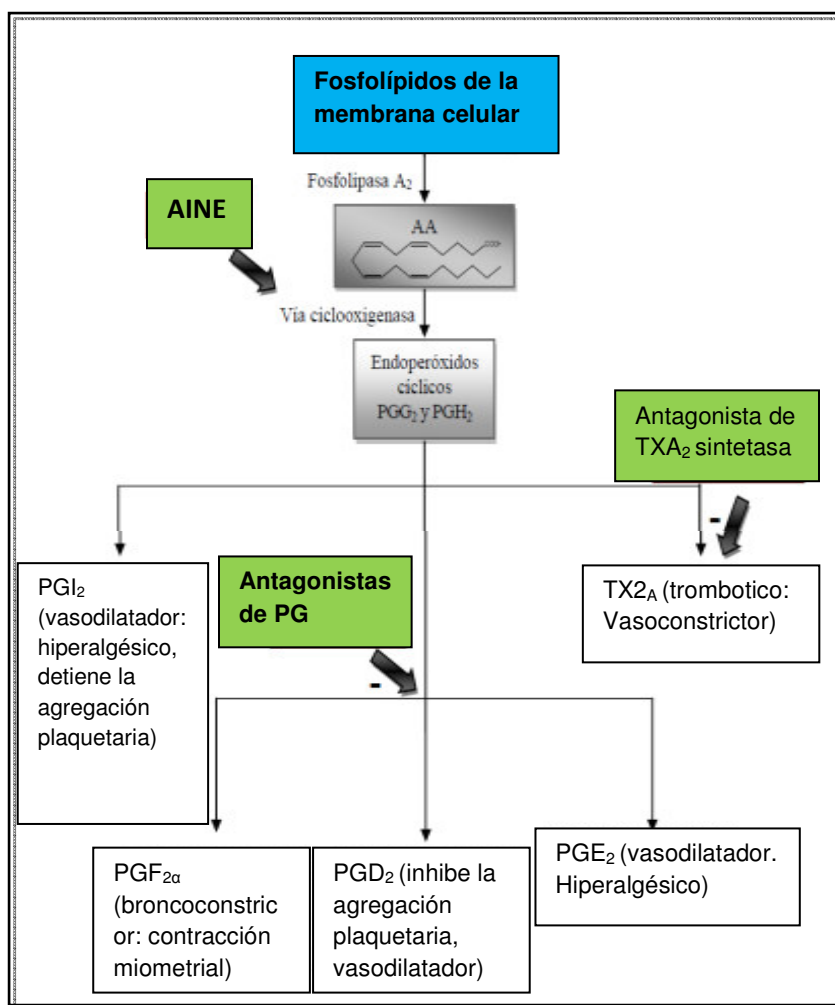


Figura 19. Mediadores inflamatorios derivados del metabolismo del AA por la vía de la COX y fármacos que inhiben su formación⁸⁸.

➤ Indometacina

Características y mecanismo de acción: Indometacina, un derivado indólico metilado, es un potente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) no selectivo utilizado desde 1965. Se considera que el grupo carbonilo en la posición 3 le confiere acidez a la molécula y por lo tanto mayor potencia antirreumática, mientras que el grupo arilacilo en la posición 1, el metoxilo en la posición 5 y la presencia del halógeno en la posición *para* del grupo 1-benzoilo (Fig. 20), son en gran parte los

responsables de su actividad antiinflamatoria, ya que estos grupos pueden formar puentes de hidrógeno que retardan su absorción y prolongan sus efectos¹⁰².

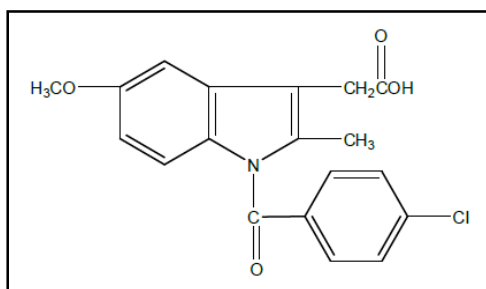


Figura 20. Estructura de la indometacina

La indometacina es un potente inhibidor de la vía de la COX, más afín por la COX-1, por lo tanto inhibe la síntesis de prostaglandinas. Reduce la producción de renina por parte de las células yuxtaglomerulares, lo cual puede dar como resultado importantes efectos sobre la presión arterial, el agua y la sal, independientes de las prostaglandinas.

La actividad antiinflamatoria de la indometacina, fue demostrada por primera vez en animales, al medir su capacidad para inhibir la formación del granuloma o el edema inducido por la inyección subplantar de la carragenina en ratas.

Farmacocinética y farmacodinamia: La indometacina posee una excelente biodisponibilidad por vía oral, pero también puede ser absorbida en la mucosa rectal cuando se administra en supositorios.

Una vez absorbida, se alcanzan concentraciones máximas en 1 o 2 h y se une en un 90% a las proteínas plasmáticas. La concentración del fármaco en el líquido cefalorraquídeo es pequeña, pero la del líquido sinovial es igual a la del plasma, en cuestión de 5 h después de la administración.

2.4.2. Actividad antioxidante

A. Daño o estrés oxidativo

La oxidación es todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrogeno (deshidrogenacion) y reducción es el proceso en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción, por lo que son llamados reacción de óxido-reducción o reacción redox¹⁰³.

Generalmente, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2); sin embargo, por reacciones puramente químicas, acciones enzimáticas o por efectos de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismos y producir daño celular; pueden dañar a las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alterar los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción genética, etc.).

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio de las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura - función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; siendo este el mecanismo

general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social¹⁰⁴.

B. Radicales libres

Los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad; son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca del sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto bioquímico, son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos. Dentro de las fuentes de sustancias oxidantes, tenemos dos grupos:

1. Endógenas: cadena de transporte electrónico mitocondrial, peroxisomal y microsomal (citocromo p-450 y citocromo b5), enzimas citoplasmáticas (como la OXD, catecolaminas y riboflavina) y enzimas fagocíticas (como la mieloperoxidasa y la NADPH-oxidasa).
2. Exógenas: xenobioticos, (benzopirenos, quinonas, bipirilidos), el humo del cigarro, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro y cobre), las radiaciones y la hiperoxia (Montero, 1996).

No obstante, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica importante en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno, y la síntesis de prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándula suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales.

Las especies reactivas del oxígeno inorgánicas más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\cdot) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, dentro de los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^\cdot), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados¹⁰⁵.

Desde el punto de vista médico, el radical hidroxilo (HO^\cdot) y el radical superóxido (O_2^-) son los de mayor interés; estas especies reactivas de oxígeno, cada uno con un electrón aislado, pueden atacar y dañar casi cualquier molécula presente en el cuerpo. Son tan activos que una vez formados, sólo transcurre una pequeña fracción de segundo antes de que se unan a algo. Al hacerlo así, pueden ceder su electrón desapareado o capturar un electrón de alguna otra molécula para componer la pareja. En cualquiera de ambos casos, los radicales llegan a ser estables, pero la molécula atacada es a su vez, convertida en radical. Esto inicia una reacción en cadena que es capaz de cruzar destructivamente a través de un tejido¹⁰⁶.

C. Efectos nocivos de los radicales libres

Los daños que los radicales libres pueden ocasionar en las células son: destrucción de las proteínas de la membrana ocasionando la pérdida de la identidad de la célula, fusión de los lípidos (grasas) y las proteínas de la membrana, endureciéndola, haciéndola más frágil y quebradiza, punción de la membrana celular permitiendo que las bacterias y virus puedan penetrar

fácilmente, ruptura de la membrana nuclear abriendo el núcleo y dejándolo expuesto al material genético, mutación y destrucción del material genético, reimprimiendo y destruyendo la anterior información genética, y amenaza al sistema inmunológico mediante la debilitación de las células inmunes debido a tales daños. Como resultado, el daño de los radicales libres se ha relacionado con diferentes procesos patológicos, como la aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal aguda y crónica, diabetes mellitus, hipertensión arterial, cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica distrofia muscular, artritis e inflamación, enfisema pulmonar e incluso el mismo proceso de envejecimiento¹⁰⁷.

D. Antioxidantes

Los antioxidante son sustancias que donan electrones a estos radicales poniendo fin a la reacción en cadena, estabilizando así al átomo¹⁰⁸. La capacidad antioxidante está dada por mecanismos a través de los cuales la célula disminuye significativamente la reactividad o inhibe la generación de radicales libres¹⁰⁴.

Las funciones que ejercen los antioxidantes se realizan por el aumento de la velocidad de ruptura de los radicales libres, mediante la prevención de la participación de iones metales de transición en la generación de radicales libres o mediante la desactivación o secuestro de radicales libres.

Los compuestos con propiedades antioxidantes empleados en las diferentes industrias, incluida la alimentaria, pueden ser naturales o sintéticos. Entre los antioxidantes sintéticos que más se utilizan en alimentos se encuentran el Hidroxianisol butilado (BHA) y el Hidroxitolueno butilado (BHT). Estos compuestos tienen la desventaja de ser muy volátiles y, además, se sospecha que son perjudiciales para la salud. Debido a esto, en la actualidad existe una importante

presión por parte de los consumidores que incentiva la utilización de productos que provengan de fuentes naturales y que sean obtenidos por tecnologías no contaminantes¹⁰⁹.

En general, los sistemas antioxidantes se engloban en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y metabolitos de bajo peso molecular⁷⁴.

E. Sistemas antioxidantes enzimáticos

Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas están constituidos por enzimas superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa¹¹⁰. La enzima SOD cataliza la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En plantas se han identificado tres isoenzimas SOD que difieren entre sí en el grupo prostético metálico ligado a la enzima. Una clase contiene cobre y zinc (CuZnSOD) y las otras dos restantes contienen hierro (FeSODs) y manganeso (MnSODs), respectivamente. En cuanto a su localización, las FeSODs se encuentran únicamente en el cloroplasto, las MnSODs se localizan principalmente en las mitocondrias y las CuZnSODs se encuentran en el cloroplasto, citosol, apoplasto y peroxisomas. El H_2O_2 generado por la SOD es eliminado por las enzimas CAT y APX.

La CAT (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular oscila entre 210-280 kDa. La CAT cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en H_2O y O_2 . A nivel celular se encuentra en los peroxisomas y, al menos en el maíz, también se encuentra en mitocondrias¹¹¹. El número de recambio de esta enzima es muy elevado (200.000

ciclos catalíticos $\times s^{-1}$ \times subunidad), pero su afinidad por el H_2O_2 es muy baja y, en consecuencia ciertos niveles de H_2O_2 permanecen en la célula.

La APX es capaz de eliminar bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su elevada afinidad por éste. La APX es una hemoperoxidasa que utiliza el ascorbato como dador de electrones para llevar a cabo la reducción del H_2O_2 . A nivel celular se encuentra, fundamentalmente, en cloroplastos, citosol y peroxisomas aunque también se ha localizado en algunas especies en el apoplasto¹⁰⁹.

Junto con las actividades de las enzimas CAT y APX, el ciclo ascorbato/glutación (también denominado ciclo de Halliwell-Asada) participa, asimismo, en la eliminación de H_2O_2 en células vegetales¹¹². Este ciclo posee una serie de reacciones redox acopladas en las que intervienen cuatro actividades enzimáticas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2)^{112,113}. En este ciclo, el peróxido es eliminado por la actividad APX utilizando el ascorbato como donador de electrones. El monodehidroascorbato (MDHA) formado, y a partir de éste el dehidroascorbato (DHA) resultante por dismutación espontánea, se utilizan para reciclar el ascorbato mediante actividades enzimáticas MDHAR y DHAR, respectivamente.

La actividad MDHAR utiliza el NAD(P)H como donador de electrones mientras que la actividad DHAR regenera el ascorbato utilizando el poder reductor suministrado por el glutación reducido (GSH). A su vez, el glutación oxidado (GSSG) formado, es de nuevo reciclado hasta GSH por la acción de GR en una reacción dependiente de NADPH. El balance global del ciclo es eliminar el H_2O_2 a expensas del NAD(P)H. El ciclo ascorbato/glutación se ha identificado en el estroma del

cloroplasto –que constituye el principal sistema destoxificador de H_2O_2 - en el citosol, los peroxisomas y la matriz mitocondrial¹¹⁰. Fig. 21.

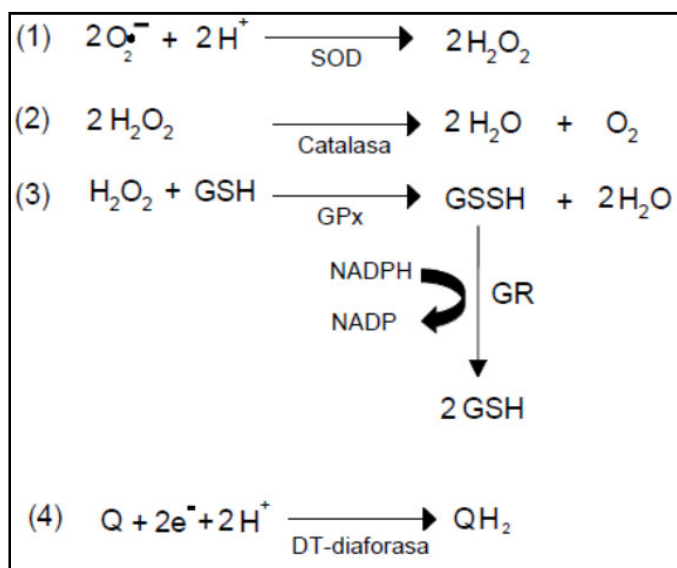


Figura 21. Mecanismo de reacción de enzimas antioxidantes¹¹⁴

Otras enzimas implicadas en la eliminación del H_2O_2 que juegan importante papel en la protección frente al estrés oxidativo son las guayacol-peroxidasas^{111,115,116}. Estas enzimas utilizan múltiples dadores electrónicos, principalmente compuestos fenólicos, para reducir el H_2O_2 . En células vegetales se han descrito un gran número de isoperoxidasas localizadas en vacuolas y en el apoplasto y debido a sus dos posibles ciclos catalíticos, peroxidativo e hidroxílico, pueden generar EAO, y regular los niveles de H_2O_2 ¹¹⁵. Además de los sistemas enzimáticos descritos, las células vegetales cuentan con otros sistemas implicados en la eliminación de EAO que se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales sistemas antioxidantes enzimáticos presentes en plantas^{110,150}

Sistema antioxidante	Localización	Principal EAO
Superóxido dismutasa ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	$O_2^{\bullet-}$
Ascorbato peroxidasa ($2 AA + H_2O_2 \rightarrow 2 MDA + 2H_2O$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria. Peroxisoma. Apoplasto	H_2O_2
Catalasa	Peroxisoma	H_2O_2
Peroxidasa	Pared celular. Vacuola	H_2O_2
Monodehidroascorbato reductasa [$MDA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)$]	Cloroplasto. Mitocondria	
Dehidroascorbato reductasa (DHAR) ($DHA + 2 GSH \rightarrow AA + GSSG$)	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutathión reductasa (GR) $GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2 GSH + NAD(P)$	Cloroplasto. Mitocondria	
Glutathion Peroxidasa ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$)	Citosol	$H_2O_2, ROOH$
Ferritina ($Fe + P \rightarrow P-Fe$)	Citosol. Cloroplasto	
NADPH oxidasa. Oxidasa alternativa (AOX) ($2 e^- + 2 H + O_2 \rightarrow H_2O$)	Mitocondria	
Peroxiirredoxina (PrxR) ($2P-SH + H_2O_2 \rightarrow P-S-SP + 2 H_2O$)	Cloroplasto	
Tiorredoxina (Trx) ($P-S-S-P + 2H^+ \rightarrow 2P-SH$)	Cloroplasto	
Glutarredoxina (GLR) ($DHA + 2 GSH \rightarrow AA + GSSG$)	Cloroplasto. Citosol. Mitocondria	

F. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa que causan las EAO y otros agentes oxidantes.

Estos compuestos neutralizan los radicales libres cediéndoles un electrón y dando lugar a la formación de especies no reactivas. Muchos compuestos podrían servir para este fin teniendo en cuenta que las EAO son extremadamente reactivas, y por tanto son capaces de extraer un electrón de prácticamente cualquier molécula disponible. Sin embargo, un antioxidante biológico eficaz debe hacer algo más que reaccionar con los radicales libres, debe: a) estar presente y tener una concentración adecuada en la célula, b) reaccionar con una gran variedad de radicales libres y, c) ser capaz de regenerarse¹¹⁷. En las células vegetales existen varios compuestos -tanto de naturaleza hidrosoluble como liposoluble- que cumplen estas propiedades. Los principales antioxidantes de naturaleza hidrosoluble que controlan la homeóstasis redox son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, los liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides (ver Tabla 3). Sin embargo, las EAO, en determinadas circunstancias, juegan un papel esencial en la ruta de transducción de señales y en los mecanismos de activación enzimática. Esto indica que la función de los antioxidantes no es la de eliminar por completo las EAO sino la de regular de forma muy precisa los niveles de estas especies. Por tanto, para elucidar la función de estos antioxidantes es esencial identificar los factores que modifican sus niveles, su distribución espacial y el estado redox en la célula¹¹³.

G. Antioxidantes naturales

Los antioxidantes naturales, particularmente en las frutas y vegetales, han tenido un interesante crecimiento en el consumo y en la comunidad científica, ya que

estas sustancias son las encargadas de la prevención de numerosas enfermedades que aquejan profundamente a la sociedad moderna.

Los principales efectos beneficiosos de los antioxidantes naturales son relacionados con tres grandes grupos: vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides¹¹⁸.

La vitamina C es un antioxidante hidrosoluble, el efecto producido por esta vitamina está mediado por la interacción directa con varias especies reactivas del oxígeno incluidas en ozono y el óxido nítrico, la vitamina C neutraliza otras especies reactivas como el ácido hipocloroso y genera la forma activa de otros antioxidantes. Además inhibe la formación de especies reactivas del oxígeno mediada por el hierro de las ferroproteínas y el peróxido de hidrogeno. La vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras¹¹⁹.

La vitamina E es un antioxidante lipofílico, considerado un importante agente secuestrador de radicales peróxidos, oxígenos singlete y otras especies reactivas del oxígeno en las fases lipídicas biológicas como membranas y lipoproteínas; muy importante en los tejidos nervioso y muscular. La vitamina E se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, gérmenes de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas.

Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas y verduras en donde ejercen potente actividad antioxidante necesaria para el funcionamiento de las células vegetales, siendo los más representativos los compuestos denominados flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes. Los flavonoides contienen

en su estructura química un grupo variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías¹¹⁴.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus excelentes propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, así como la inhibición de oxidasas tales como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa. Otros mecanismos podrían incluir la inhibición de la enzima involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, este es el caso de la fosfolipasa A2 y la estimulación de otras con reconocidas propiedades antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa. De esta forma los flavonoides pueden interferir no sólo en las reacciones de propagación de radicales libres sino también con la formación del radical en sí¹²⁰.

H. Mecanismo de acción de la actividad antioxidante:

- **Captadores de radicales libre:** los compuestos fenólicos pueden actuar como donadores de hidrogeno o electrones en reacciones de terminación que rompen el ciclo de generación de nuevos radicales libres, deteniendo las reacciones en cadena en las que están implicadas los radicales libres.

Fig. 22.

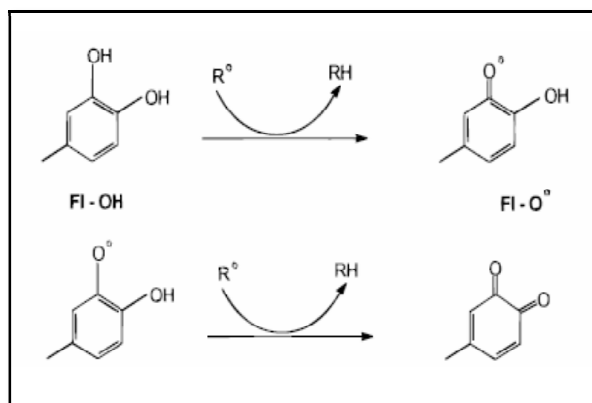


Figura 22. Secuestro de EAO (R•) por flavonoides¹²¹

- **Quelantes de metales:** requieren la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático. De este modo, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres por la reacción de fenton¹²².

Sin embargo, existen otros factores que afectan la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Así, el número y posición de los grupos hidroxilos, la presencia de azúcares unidos y el grado de polimerización determinarán propiedades de los compuestos fenólicos tales como solubilidad y tendencia a ceder electrones o átomos de hidrógeno.

El grado de polimerización de los compuestos fenólicos tiene un marcado efecto sobre la actividad antioxidante. Así, los compuestos poliméricos son más potentes como antioxidantes que los monómeros¹²².

2.4.3. Actividad antienzimática

A. Enzimas:

Las enzimas son biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (Fig. 23).

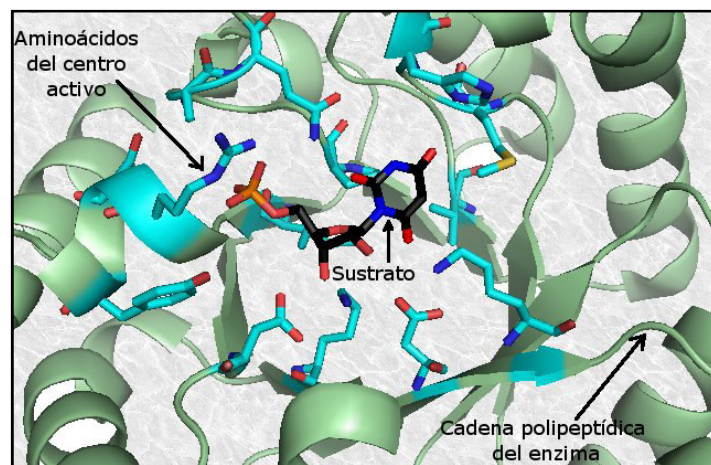


Figura 23. Estructura de las enzimas: centro activo (*fuentes: Alejandro Porto Andión*)

Especificidad de las enzimas: Las enzimas, además de ser unos catalizadores muy eficaces, presentan un alto grado de especificidad química. Una enzima es capaz de discriminar entre dos sustancias que potencialmente podrían actuar como sustratos.

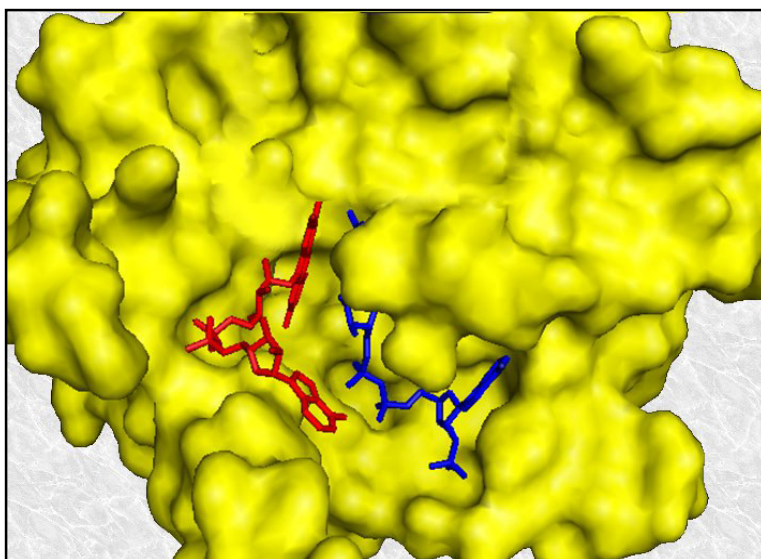


Figura 24. Especificidad de las enzimas (*Fuente: Alejandro Porto Andión*)

La relación que existe entre la enzima y su sustrato es un caso particular de un fenómeno más amplio: la relación entre las proteínas y sus respectivos ligandos. Podemos afirmar que entre la enzima y su sustrato se da un acoplamiento espacial (el sustrato "encaja" en el centro activo de la enzima) y químico (ambos poseen grupos funcionales que pueden establecer interacciones débiles entre sí). La especificidad de las enzimas reside en esta complementariedad estructural (Figura 23). Así, aquellos potenciales sustratos que, por falta de acoplamiento espacial y/o químico, no puedan acceder al centro activo de la enzima, no podrán ser transformados por él. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que, en muchos casos, no es la totalidad de la molécula de sustrato, sino solamente una parte de ella, denominada grupo determinante de la posición, la que se acopla espacial y químicamente con el centro activo.

Aunque las enzimas son en general muy específicas al comparadar con cualquier catalizador artificial, su grado de especificidad resulta ser muy variado. Existen

enzimas con una especificidad muy estricta que sólo reconocen a un sustrato determinado y no inducen la transformación de otras moléculas aunque estén estructuralmente muy relacionadas con él; algunas enzimas incluso son capaces de distinguir entre formas estereoisómeras de una misma sustancia (por ejemplo la lactato-deshidrogenasa sólo es capaz de deshidrogenar al estereoisómero L del ácido láctico). En el otro extremo del espectro de especificidades se encuentran enzimas con una especificidad relativamente amplia: pueden inducir la transformación de toda una serie de sustratos que presentan determinado rasgo estructural común (por ejemplo la fosfatasa alcalina induce la hidrólisis de diferentes ésteres del ácido fosfórico). Existen entre ambos extremos todos los grados de especificidad imaginables.

C. Inhibición enzimática

Los inhibidores son sustancias que inhiben o anulan la acción de las enzimas sin ser transformados por ellos. Su estudio resulta de gran utilidad a la hora de comprender los mecanismos de catálisis, la especificidad de las enzimas y otros aspectos de la actividad enzimática. La inhibición enzimática puede ser irreversible o reversible, esta última comprende a su vez tres tipos: inhibición competitiva, acompetitiva y no competitiva.

- **Inhibición irreversible:** Algunos inhibidores se combinan de modo permanente con la enzima uniéndose covalentemente a algún grupo funcional esencial para la catálisis con lo que la enzima queda inactivado irreversiblemente. El estudio de este tipo de inhibidores ha resultado de

gran utilidad para identificar los grupos funcionales esenciales para la catálisis en aquellas enzimas a los que inactivan.

Este tipo de inhibición se conoce también como "envenenamiento" de la enzima. Por ejemplo algunos compuestos organofosforados tóxicos llamados venenos nerviosos, que se utilizan como insecticidas, actúan inhibiendo irreversiblemente a la enzima acetilcolinesterasa, la cual interviene en la actividad del sistema nervioso. Se sabe que estos compuestos organofosforados inactivan a la enzima formando un enlace éster fosfórico con el grupo hidroxilo de un determinado resto del aminoácido serina, lo que demuestra que ese grupo funcional es esencial para la catálisis.

- **Inhibición reversible:** Los inhibidores reversibles se combinan transitoriamente con la enzima, de manera parecida a como lo hacen los propios sustratos. Algunos inhibidores reversibles no se combinan con la enzima libre sino con el complejo enzima-sustrato.

Se distinguen tres tipos de inhibición reversible:

Inhibición competitiva: El inhibidor es una molécula que presenta un cierto parecido estructural con el sustrato, de manera que puede competir con él por acceder al centro activo, pero que no posee ningún enlace susceptible de ser atacado por la enzima (Fig. 25). El inhibidor forma con la enzima libre un complejo enzima-inhibidor de características cinéticas análogas a las del complejo enzima-

sustrato, pero que, lógicamente, no puede descomponerse a continuación para dar lugar a la enzima libre y a los productos:

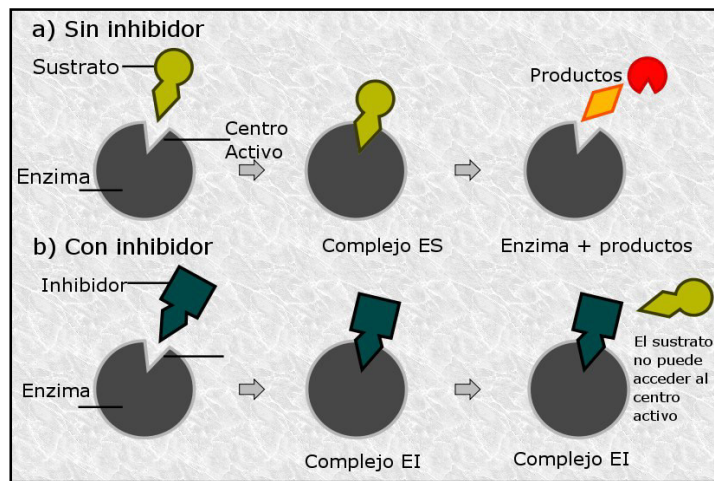


Figura 25. Inhibición competitiva (*Fuente: Alejandro Porto Andión*)

Inhibición incompetitiva: El inhibidor no se combina con la enzima libre ni afecta a su unión al sustrato, sino que lo hace con el complejo enzima-sustrato dando lugar a un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor, que no se descompone posteriormente para dar lugar a los productos (Fig. 26). El inhibidor se coloca próximo al centro activo situado de tal manera que impide físicamente la salida de los productos:

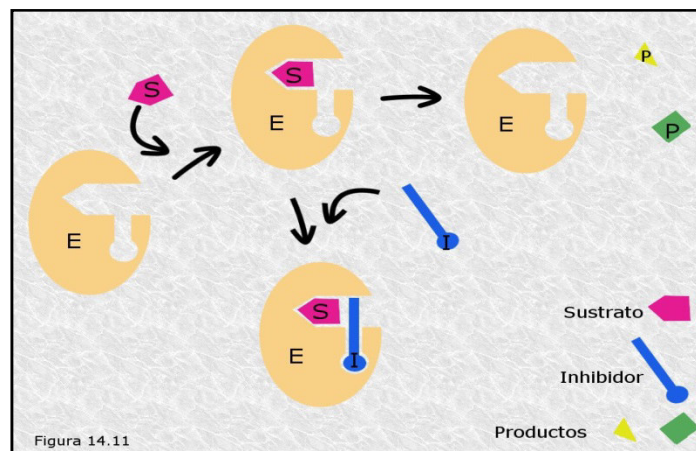


Figura 26. Inhibición incompetitiva (*Fuente: Alejandro Porto Andión*)

Inhibición no competitiva: El inhibidor puede combinarse con la enzima libre o bien con el complejo enzima-sustrato, interfiriendo en la acción de ambos. Los inhibidores no competitivos se unen a un lugar de la enzima diferente del centro activo provocando en ella una alteración que dificulta bien la formación del complejo enzima-sustrato o bien la descomposición de éste para dar lugar a los productos (Fig. 27). La unión con el inhibidor produce dos formas inactivas: los complejos EI y ESI, ninguna de las cuales puede descomponerse para dar lugar a los productos y a la enzima libre:

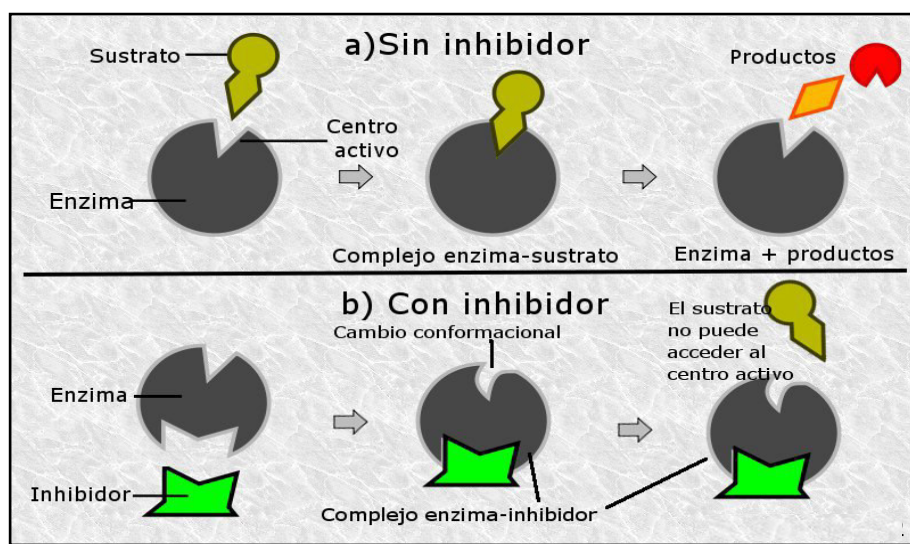


Figura 27. Inhibición no competitiva

Aunque podría pensarse que los distintos tipos de inhibición pueden desempeñar algún papel en la regulación de la actividad enzimática, no es así ya que la regulación de la actividad enzimática se lleva a cabo mediante mecanismos que no se ajustan a ninguno de los modelos de inhibición. El interés del estudio de la inhibición enzimática reside más en su utilidad para comprender la estructura,

mecanismos catalíticos y especificidad de las enzimas, que en una importancia biológica real¹²³.

El proceso de envejecimiento de la piel se ha dividido en dos categorías:

- El envejecimiento intrínseco y extrínseco^{124,125}. Envejecimiento de la piel intrínseca o envejecimiento natural es causada por los cambios en la elasticidad de la piel con el tiempo.
- Envejecimiento de la piel extrínseca es predominantemente resultado de la exposición a la radiación solar (fotoenvejecimiento)¹²⁶. Exposición a rayos UV causa cambios físicos en la piel debido a las alteraciones que se producen en el tejido conectivo a través de la formación de peróxidos de lípidos, contenido en células y enzimas¹²⁷, y especies reactivas de oxígeno (ROS). Peróxidos lipídicos pueden ser metabolizados para formar productos secundarios que dañan la matriz extracelular (ECM) mientras ROS se acreditan con la participación en la pérdida de elasticidad de la piel¹²⁸ y en enfermedades tales como la artritis, la diabetes y el cáncer. Los sistemas biológicos necesitan ROS para vías metabólicas y por lo tanto el organismo es capaz de formar especies reactivas tales como superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO)¹²⁷. Cuando ROS son sobreproducidos, la transición redox activa iones de metales tales como el hierro (II) o cobre (II) los que pueden causar estrés oxidativo severo, por lo tanto dañar constituyentes de tejidos, el ADN celular, proteínas, lípidos y carbohidratos. El superóxido dismutasa (SOD) que, naturalmente, rompe O_2 , en H_2O_2 y O_2 tiene un corto plasma de vida media, y por lo tanto nuevos miméticos de SOD se están desarrollando¹²⁹. Los flavonoides derivados de plantas pueden formar complejos con iones metálicos que

significa que tienen el potencial para enlazar con metaloenzimas alterando así o inhibiendo las vías metabólicas¹³⁰; los complejos flavonoides-metal han demostrado potencial para ser miméticos de SOD¹³¹.

El 80 % de peso seco de la piel es colágeno, es responsable de la resistencia a la tracción de la piel. La elasticidad es debida a la red de fibra elastina que constituyen el 2-4 % de la ECM y glicosaminoglicanos (GAG's) que participan en la hidratación de la piel¹²⁴. Las fibras de colágeno, fibras de elastina y GAGs son producidas por los fibroblastos y son principalmente afectados por fotoenvejecimiento que resulta en cambios visibles en la piel tales como arrugas, pigmentación y cambios en el espesor¹²⁵, ROS son también capaces de inducir la expresión de proteasas que son responsables de la remodelación de la matriz extracelular tales como metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y proteasas de serina¹³².

MMPs son parte de un grupo de transmembrana que contiene zinc endopeptidasas que incluyen collagenasas y gelatinasas. Las collagenasas son metaloproteinasas capaces de degradar otras moléculas que se encuentran dentro de la célula, por ejemplo, collagenasa-2 (MMP-8) puede degradar, elastina, fibronectina, gelatina y laminina, así como colágeno¹³³. Collagenasa divide el enlace X-Gly de colágeno y también péptidos sintéticos que contienen la secuencia -Pro-X-Gly-Pro, donde X es casi cualquier aminoácido previsto de un extremo amino terminal bloqueado¹³⁴.

Otro sistema proteolítica implicada en la degradación del ECM es la de las proteasas de serina uno de los cuales es elastasa, miembro de la familia de la

quimotripsina de proteasas, es responsable principalmente de la descomposición de elastina, que es una proteína importante que se encuentra dentro de la ECM. La elastina, debido a sus singulares propiedades de retroceso elástico, es vital para dar elasticidad a las arterias, los pulmones, los ligamentos y piel¹³⁵. Elastasas pueden degradar elastina, así como tener una amplia cartera de sustrato, incluyendo la capacidad para degradar el colágeno, la fibronectina y otras proteínas ECM¹³². Al igual que con las metaloproteinasas, bajo condiciones normales de la actividad de la elastasa es necesario después de degradar proteínas extrañas dentro de la ECM durante la fagocitosis por los neutrófilos para permitir la reparación de tejidos¹³⁶. En términos de antienviejecimiento, la búsqueda de inhibidores de enzimas elastasa puede ser útil para prevenir la pérdida de elasticidad de la piel y por lo tanto flacidez de la piel.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

➤ Materiales:

Aguja, baguetas, beaker, cubetas para espectrofotómetro, embudo simple, frasco ámbar, fiolas, jeringa (1-10 mL), matraz, micropipetas, papel filtro pipetas, placa de toques puntas sueltas (1.0 – 1000) μ L, tubo de ensayos, viales de vidrio.

➤ Material biológico:

Vainas de *Caesalpinia spinosa* “tara”.

➤ Reactivos:

Alcohol etílico 70%, agua destilada, etanol 96°, metanol absoluto, elastase from porcine páncreas lyophilized powder (Sigma), N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide elastase substrate (Sigma), Trizma 7-9® (Sigma), epigallocatechin gallette (Fluka), collagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma), Tris glycine buffer (Fluka), N-[3-(2-Furil) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (Sigma), λ -Carrageenan plant mucopolysaccharide (Sigma), DPPH (Aldrich), water Chromasolv® for HPLC, Trolox® (Sigma), ABTS (Sigma), suero fisiológico, Indometacina, persulfato potásico, NaCl, Ca_2Cl , galato de epigallocatequina (EGCG), buffer THAM 7-9® (Sigma), Molish A, antrona, FeCl_3 , gelatina. Reactivos de ninhidrina, Shinoda, Liberman Buchardat, Bortranger, Dragendorff, Mayer, Sonnenchein, Rosenheim, Hidroxilamina y vainillina.

➤ Equipos:

Balanza analítica electrónica Ohaus Explorer, estufa Witeg WiseVen WON, espectrofotómetro VIS marca UNICO modelo S-1200-E, pletismómetro digital

(digital plethysmometer LE7500 PANLAB s.l.u.), refrigerador CODEX, molino de cuchillas, cronometro Cassio.

3.2. Entidades donde se desarrolló la investigación

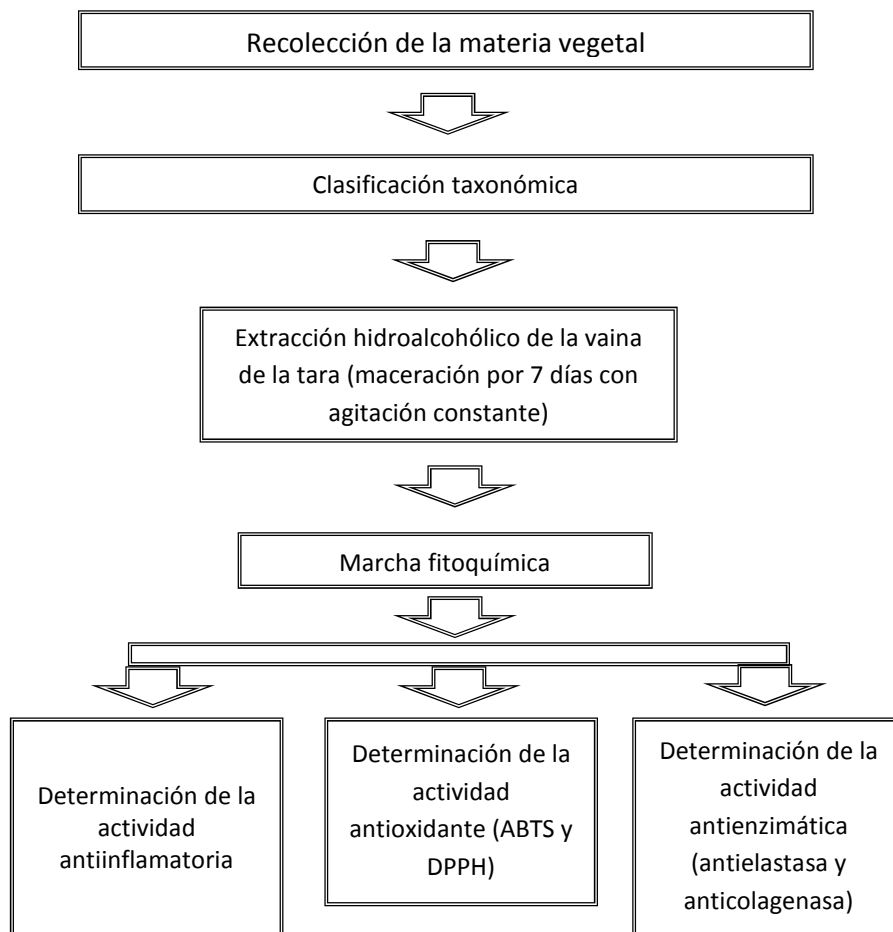
La obtención del extracto hidroalcohólico por el método de macerado, la marcha fitoquímica y la determinación de la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) se desarrollaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM y la investigación de la actividad antienzimática (anticolagenasa y antielastasa) se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

La determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de inducción de edema plantar inducido por λ - carragenina se desarrolló en la Facultad de Medicina de la UNMSM.

3.3. Tipo de investigación

Esta investigación corresponde al tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

3.4. Flujograma de trabajo experimental



3.5. Recolección del material

La planta fue recolectada en la provincia de Huanta, región de Ayacucho a 2628 metros de altitud. Identificada posteriormente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos donde fue clasificado como de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”. Fig. 28 y anexo N° 1.



Figura 28. Vainas de tara para preparación del extracto hidroalcohólico

3.6. Preparación del extracto hidroalcohólico

Para obtención del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* se empleó las vainas secas de *C. spinosa* seleccionadas, limpias y desinfectadas con solución de cloro al 1%. Posteriormente se procedió al secado de forma natural por 48 horas para que esté libre de humedad.

Luego se procedió a triturar y moler en un molino de cuchillas, seguidamente se pesó 2.0 kg del polvo de las vainas y se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se agregó 6 litros de una solución hidroalcohólica de agua y etanol en una proporción de (7:3) con la finalidad de obtener una mayor concentración (debido a la solubilidad del tanino, el aumento del pH del agua favorece la salida de los taninos contenidos en la células de la materia prima).

Durante la etapa de extracción ocurren dos fenómenos paralelos, la lixiviación de las sustancias solubles de las células rotas, la disolución y difusión de las sustancias solubles de células intactas. Mientras que la primera es rápida, la difusión de las sustancias a través de las células intactas es lenta requiere etapas de humedecimiento y ablandamiento para aumentar la permeabilidad de la

membrana, por ello se dejó macerar por una semana, agitándolo todos los días, al cuarto día se agregó 1.5 L más de la solución preparada y se siguió agitando hasta completar la semana.

El producto fue filtrado utilizando una tela de micraje reducido, con el extracto obtenido se procedió al secado en una estufa a 39 °C. Al final se obtuvo una masa seca de *Caesalpinia Spinosa* de color negruzco, el cual fue molido utilizando un mortero y a partir de la masa de extracto seco se prepararon concentraciones de 50, 100, 250 g/ml las que fueron conservadas en frascos color ámbar.

3.7. Estudio farmacognóstico

3.7.1. Prueba de solubilidad

Se utilizó solventes de acuerdo a su polaridad decreciente: agua, alcohol, cloroformo, benceno y éter etílico.

3.7.2. Marcha fitoquímica

Con el extracto hidroalcohólico para la identificación de metabolitos secundarios incluye reacción de caracterización química de coloración y precipitación¹³⁷.

3.8. Estudio farmacológicos

3.8.1. Determinación de la actividad antiinflamatoria

Se evaluó por el método del edema de pata inducida por λ - carragenina, un mucopolisacárido de origen marino^{138,139}. Se utilizó 30 ratas de cepa Holtzman procedentes del Instituto Nacional Salud (INS), con peso 200 ± 50 g. Los animales fueron aclimatados una semana sometidos a ayuno con libre acceso de agua, 12

horas antes del inicio del ensayo, y distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 6 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

a) Grupo control: suero fisiológico (con carragenina)

b) Grupo con estándar farmacológico: Indometacina (con carragenina)

c) Grupo con extractos hidroalcohólicos: 50, 100 y 250 mg/kg correspondientemente (con carragenina)

Media hora después se inyectó 0.1 mL de carragenina al 1% en la aponeurosis subplantar de la pata derecha. El diámetro de la pata inyectada fue determinado con el pletismómetro digital a 0 (basal), 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de inducir la inflamación y aplicar los tratamientos; El edema se expresa como la diferencia entre el incremento de volumen de las patas (Fig. 29).

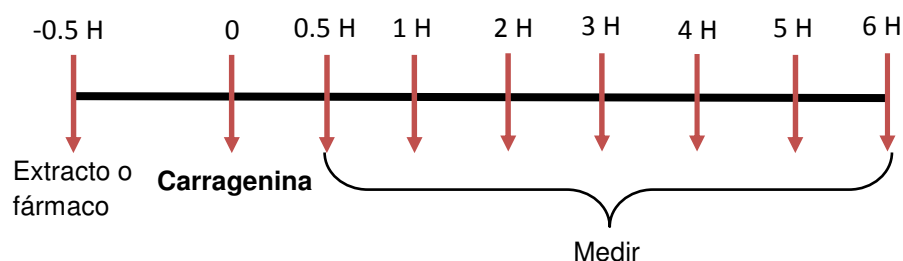


Figura 29. Esquema de administración en el edema plantar por carragenina

La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la expresión matemática descrita en el apartado.

$$\% I = \frac{(\Delta VC - \Delta Vp)}{\Delta VC}$$

Dónde:

%I: Porcentaje de inhibición del edema

ΔVC : Media aritmética del incremento de volumen de las patas en el grupo control (λ -carragenina)

ΔVp : Media aritmética del incremento de volumen de las patas en el grupo problema (extractos o fármaco)

Análisis estadístico

Se determinó la desviación típica de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, empleando el análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con un nivel de significancia del 95 % ($P \leq 0,05$) empleando el programa estadístico Minitab 17.

3.8.2. Determinación de la actividad antioxidante

➤ Captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Fundamento: El radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) es de coloración violeta; en presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora hacia amarillo pálido. La reducción del reactivo

es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 517 nm (Fig. 30).

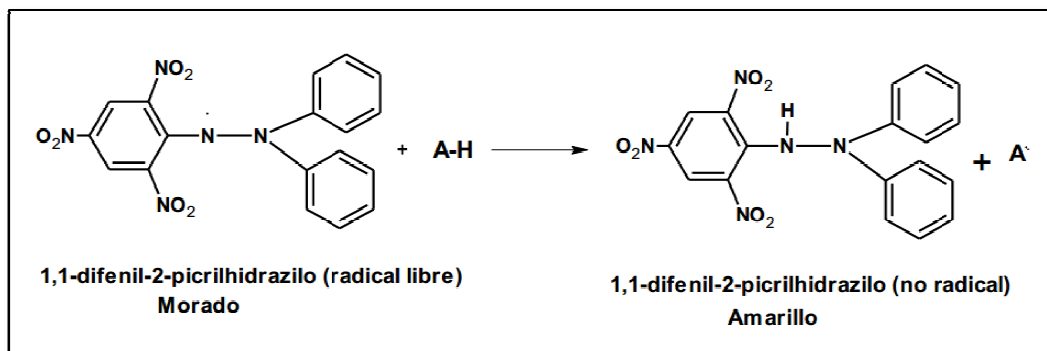


Figura 30. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Se siguió el método de Brand-Willimas, preparación de solución stock de 40 mg/100 mL de 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (DPPH, Sigma) 1 mM en metanol y almacenamiento a 4°C protegiéndola de la luz. Se calibra el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400 µL del solvente de la muestra problema y 800 µL de metanol, luego se colocó en un tubo de ensayo 400 µL de la muestra problema y 800 µL de la solución de trabajo de DPPH y agitar. Se dejó en reposo durante 30 minutos alejado de la luz y se leyó la absorbancia a 517 nm. Todos los extractos fueron medidos por triplicado a diferentes concentraciones de 0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.4 µg/mL. El mismo procedimiento para la sustancia patrón como Trolox®. Con los valores de absorbancia obtenidas se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (DPPH•), mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

El IC50 se determinó a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres del DPPH.

➤ **Captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico (ABTS^{•+})**

1. Fundamento:

El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo de color verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) con persulfato de potasio. En presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora hacia amarillo pálido. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 734 nm (Fig. 31).

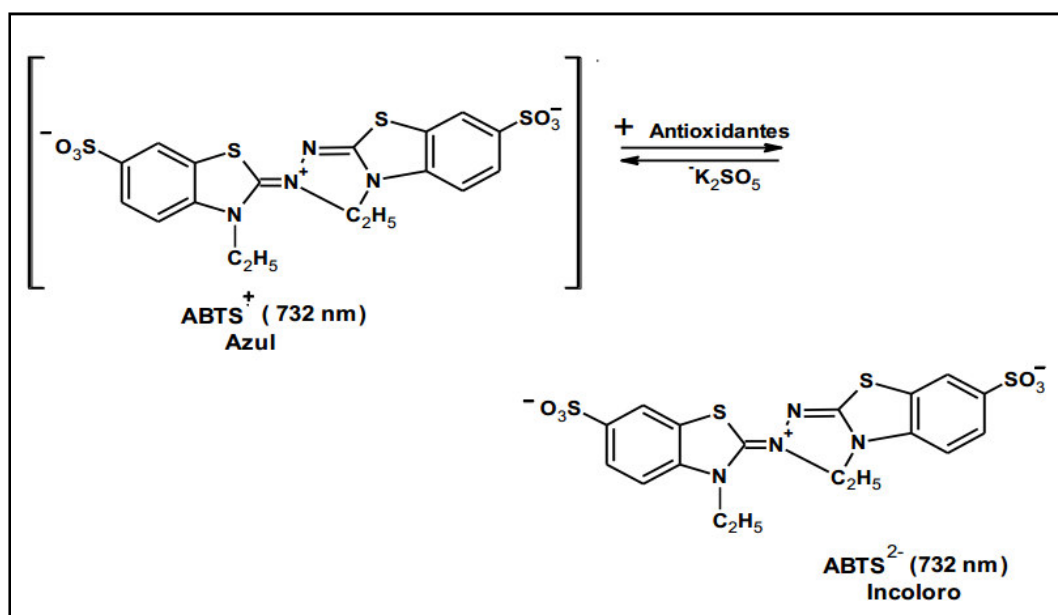


Figura 31. Estructura *in vitro* del ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante¹⁴⁰

Según la metodología de trabajo *in vitro* descrita por Kuskoski¹⁴¹, el radical ABTS* se obtiene por la reacción de ABTS (7mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y en la oscuridad durante 16 horas una vez formado el radical ABTS* se diluyo con agua bidestilada hasta obtener un valor de absorbancia (A) comprendido entre 0.7 ± 0.02 a longitud máxima de absorción 734 nm. Cada extracto se diluyo con 2 mL de etanol absoluto. A 20 uL de esta solución se añadieron 980 uL de disolución de ABTS* y se midió la absorbancia del blanco y del extracto a los 7 minutos. Para reconocer la capacidad antioxidante de los extractos se elaboraron curvas estándar de Trolox®. El antioxidante de referencia se ensayó a una concentración de 1.2 - 10 µg/mL. (Concentración final) en etanol, bajo las mismas condiciones. Para las curvas obtenida se calculó la regresión lineal, con los resultados se determinó el IC50 a partir de la gráfica del porcentaje de inhibición en función de la concentración, y corresponde a la concentración en la que se neutraliza el 50% de los radicales libres del ABTS*¹⁴².

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs. ABTS} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. ABTS}} \times 100$$

3.8.3. Determinación de la actividad antienzimática

Inhibición de enzima elastasa: El ensayo se llevó a cabo por el método descrito por Thring¹³² y consistió en incubar 25 µL de muestra (a las concentraciones finales de 5, 65, 125, 180 y 250 µg/mL) con 100 µL de la enzima elastasa pancreática porcina (PE, 2.5 µg/mL en agua HPLC) por 15 minutos y luego agregar 125 µL del sustrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala- p-nitroanilide (AAAPVN, 1,6 mM en buffer THAM, Sigma 7-9®, pH 8,0) para que la reacción se inicie. Luego de 11 minutos se midió la absorbancia a 410 nm usando una lectora de placas multifunción CHAMELEON V. Se realizó un control sin muestra y se utilizó galato

de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la enzima elastasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición elastasa} = \frac{(Abs_0 - Abs_m)}{Abs_0} \times 100$$

Dónde:

Abs_0 = Absorbancia del control (sin muestra)

Abs_m = Abs. de la mezcla con sustrato – Abs. de la mezcla sin sustrato

Las EC₅₀ (Concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el promedio de porcentaje de actividad antienzimática obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Inhibición de enzima collagenasa: El ensayo se llevó a cabo usando el método descrito por Thring¹³² y consistió en incubar 100 µL de muestra (a las concentraciones finales de 80, 160 y 250 µg/mL) con 260 µL de la enzima collagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC, 1,54 unidades/mL en buffer pH 7,5 de Tricine (N-[Tris(hidroximetil)metil]glicina) 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂) por 15 minutos y luego se agregó 240 µL del sustrato N-[3- 2 (2-furil) acrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, 2 mM en buffer pH 7,5 de Tricine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂) para que la reacción se inicie. Luego de 5 minutos se midió la absorbancia a 348 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible. Se

realizó un control sin muestra y se utilizó galato de epigallocatequina (EGCG) como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición se calculó:

$$\% \text{ Inhibición de colagenasa} = \frac{(Abs_0 - Abs_m)}{Abs_0} \times 100$$

Dónde:

Abs₀ = Absorbancia del control (sin muestra)

Abs_m = Abs. de la mezcla con sustrato – Abs. de la mezcla sin sustrato

Las EC (Concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en 50 donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el promedio de porcentaje de actividad antienzimática obtenido a partir de tres mediciones independientes.

3.9. Análisis estadístico

Los resultados son expresados en promedios (o medias) para todas las mediciones obtenidas. Se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett y la prueba de Grubbs para la determinación de valores atípicos, con un nivel de confianza de 95 % ($p \leq 0.05$) empleando el programa Minitab 17.

IV. RESULTADOS

4.1. Estudio farmacognóstico

4.1.1. Marcha fitoquímica

Estudio Fotoquímico del extracto hidroalcohólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa*, tabla N° 4.

Tabla 4: Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de la tara.

Reactivo	Metabolitos secundarios	Resultados
Molish A	Carbohidratos (azucares)	++++
Antrona	Carbohidratos (azucares)	+++
FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
Gelatina	Taninos	+++
Ninhidrina + calor	Aminoácidos libres	++
Shinoda	Flavonoides, charconas, antrona y Catequinas	++
Liberman Buchardat	Triterpenoides esteroides, antronas	+ (color naranja)
Bortranger	Naftoquinonas, antraquinonas, antronas	++++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	-
Sonnenchein	Alcaloides	+
Rosenheim	Antocianinas y flavonoides	++
Hidroxilamina	Grupo carbonilo	+
Vainillina	Glicosidos	+

Leyenda:

++++: Abundante

+++ : Suficiente

++ : Moderado

+ : Leve

(-) : Ausente

* Propia de los autores.

4.2. Estudio farmacológico

4.2.1. Actividad antiinflamatoria

Tabla 5: Promedio del volumen de la pata inflamada en las distintas horas.

Sustancias	Volumen promedio de pata inflamada (mL)						
	0.5 hora	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas
Carragenina	0.1342 ^A	0.3787 ^A	0.4583 ^A	0.5785 ^A	0.6242 ^A	0.670 ^A	0.625 ^A
50 mg/kg	0.1287 ^A	0.3134 ^A	0.3600 ^A	0.4731 ^A	0.4976	0.5425	0.4717
100 mg/kg	0.1192 ^A	0.3168 ^A	0.3717	0.4700 ^A	0.4850	0.4904	0.4000
250 mg/kg	0.1111 ^A	0.3017 ^A	0.3600	0.4500	0.4774	0.4609	0.3447
Indometacina 5 mg/kg	0.1085 ^A	0.2891	0.3400	0.4433	0.4518	0.4508	0.3233
ANOVA	p=0.781	p=0.129	p=0.027	p=0.026	p=0.001	p=0.000	p=0.000

* $p \leq 0.05$ existe diferencias significativas (ANOVA).

*Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control "carragenina" (DUNNETT).

Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de significancia de Dunnett al 95% ($P \leq 0.05$) para el volumen promedio. Ver anexo N° 3

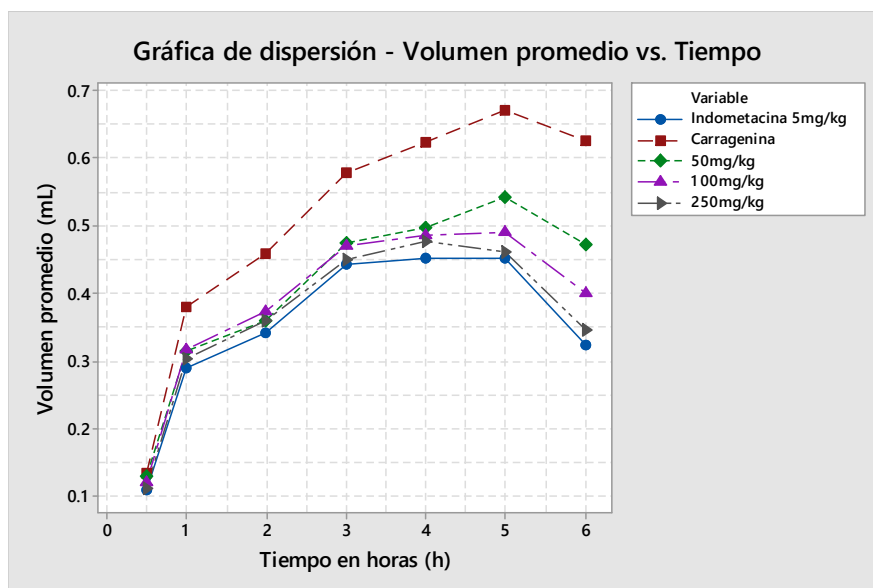


Figura 32. Gráfica del volumen promedio de la pata inflamada.

Tabla 6: Porcentaje promedio de eficiencia antiinflamatoria al evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de la vaina de la tara.

Sustancias Antiinflamatorias	Porcentaje de eficiencia antiinflamatoria (%)						
	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
50 mg/kg	4.099	17.250	21.455	18.220	20.291	19.130	24.533
100 mg/kg	11.155	16.370	18.909	18.755	22.307	26.892	36.000
250 mg/kg	17.193	20.352	21.455	22.213	23.523	31.292	44.854
Indometacina 5 mg/kg	19.130	23.670	25.818	23.365	27.620	32.795	48.267

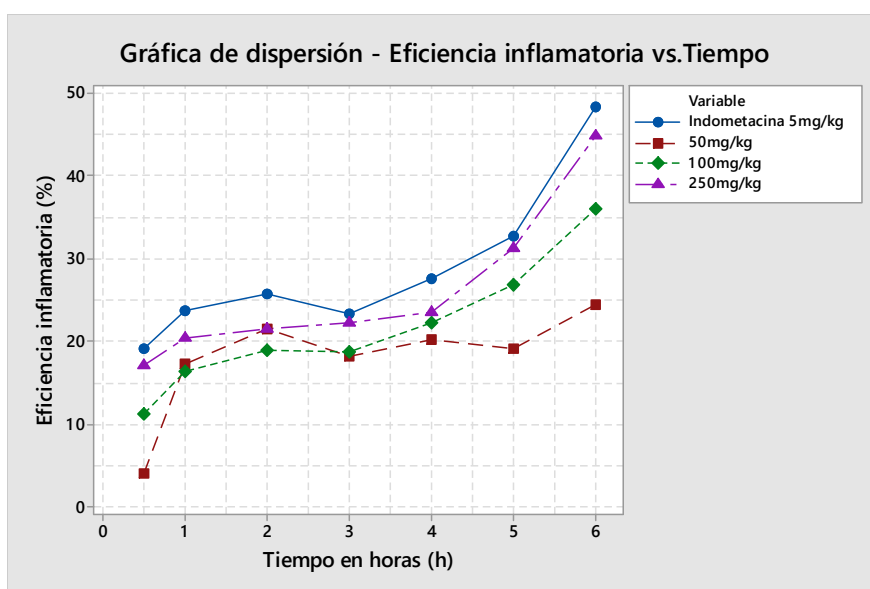


Figura 33. Eficiencia de la capacidad antiinflamatoria

4.2.2. Actividad antioxidante

➤ Método DPPH: extracto hidroalcohólico de la vaina de tara

En la tabla 6 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto hidroalcohólico de la vaina de tara.

Tabla 7. Resultados de las actividad antioxidante del extracto de tara por el método de DPPH

Sustancia antioxidante Extracto de tara (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	DPPH (% inhibición)
0	0.774 (a)	0.003	0
0.8	0.492 (b)	0.007	36.44
1.6	0.472 (c)	0.004	38.94
3.2	0.433 (d)	0.010	43.99
6.2	0.358 (e)	0.014	53.72
12.4	0.130 (f)	0.002	83.19
EC50 (µg/mL)			4.520

*Las letras distintas en las columnas indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0.05)

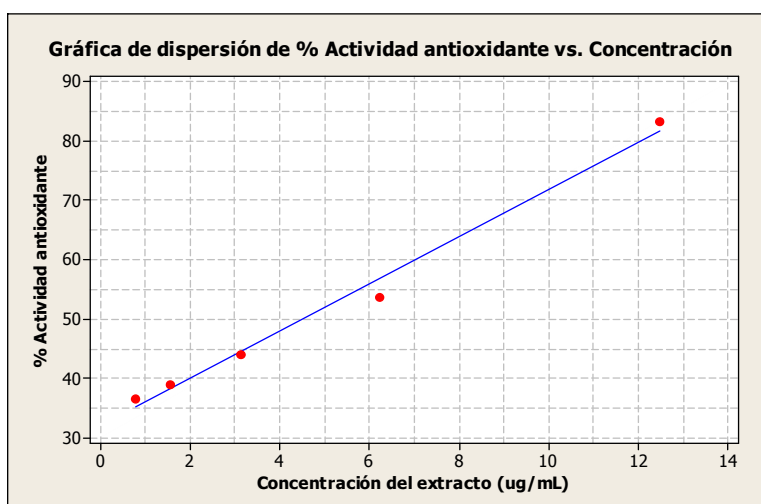


Figura 34. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición del radical DPPH.

➤ Método DPPH: solución patrón Trolox

En la tabla 8 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para la solución patrón Trolox.

Tabla 8. Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método DPPH

Sustancia antioxidante Solución patrón Trolox (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 517 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	DPPH (% inhibición)
0	0.580 (a)	0.002	0
1.2	0.562 (b)	0.007	3.11
3.6	0.332 (c)	0.011	42.68
7.2	0.094 (d)	0.007	83.78
10	0.065 (e)	0.003	88.77
		EC50 (µg/mL)	5.04

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)

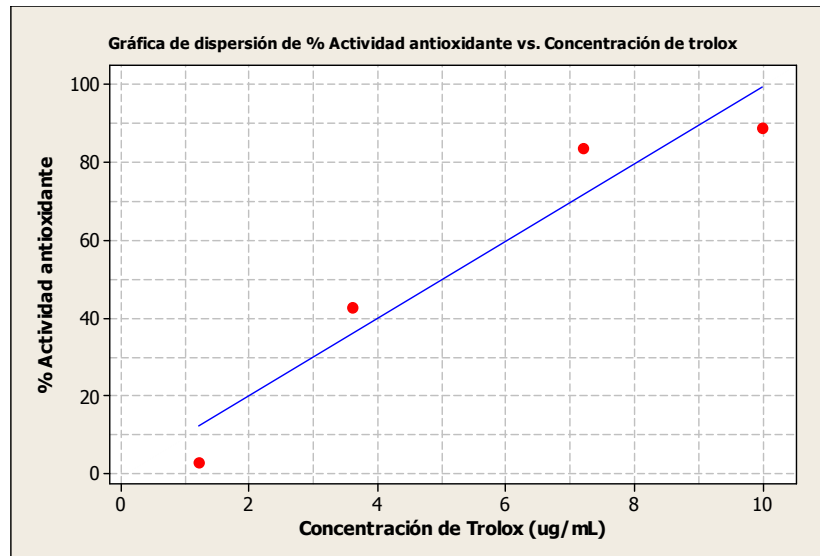


Figura 35. Correlación entre solución patrón de Trolox vs % de inhibición del radical DPPH *

➤ **Método ABTS: extracto hidroalcohólico de la vaina de tara**

En la tabla 9 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por DPPH para el extracto hidroalcohólico de la vaina de tara.

Tabla 9. Resultados de la actividad antioxidante de extracto de tara por el método de ABTS

Sustancia antioxidante Extracto de tara (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	ABTS (% inhibición)
0	0.778 (a)	0.010	0
10	0.161 (b)	0.007	39.72
15	0.217 (c)	0.017	51.8
20	0.296 (d)	0.012	61.95
25	0.375 (e)	0.013	72.11
30	0.469 (f)	0.033	79.31
EC50 (µg/mL)			14.48

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)

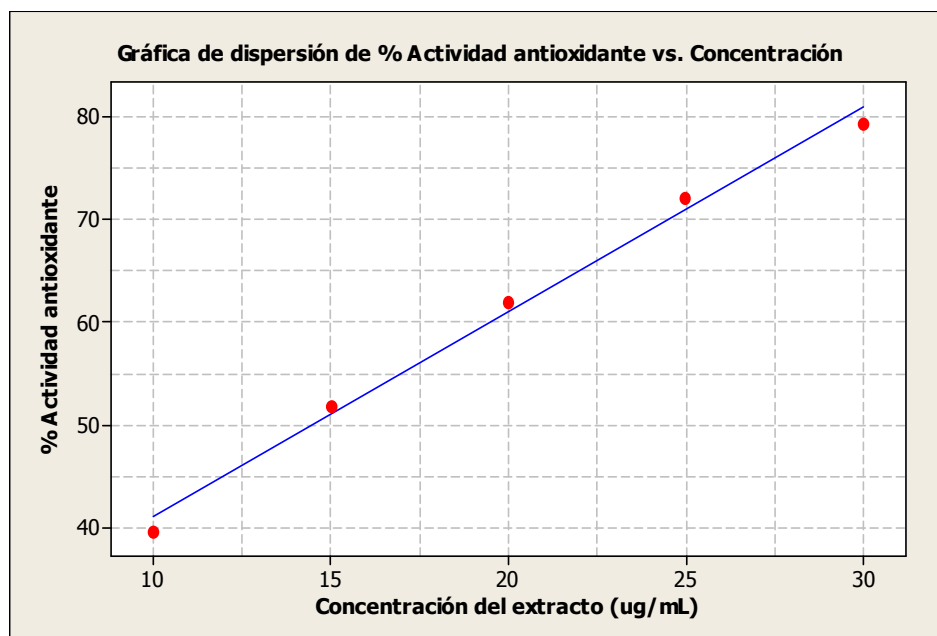


Figura 36. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición del radical ABTS *

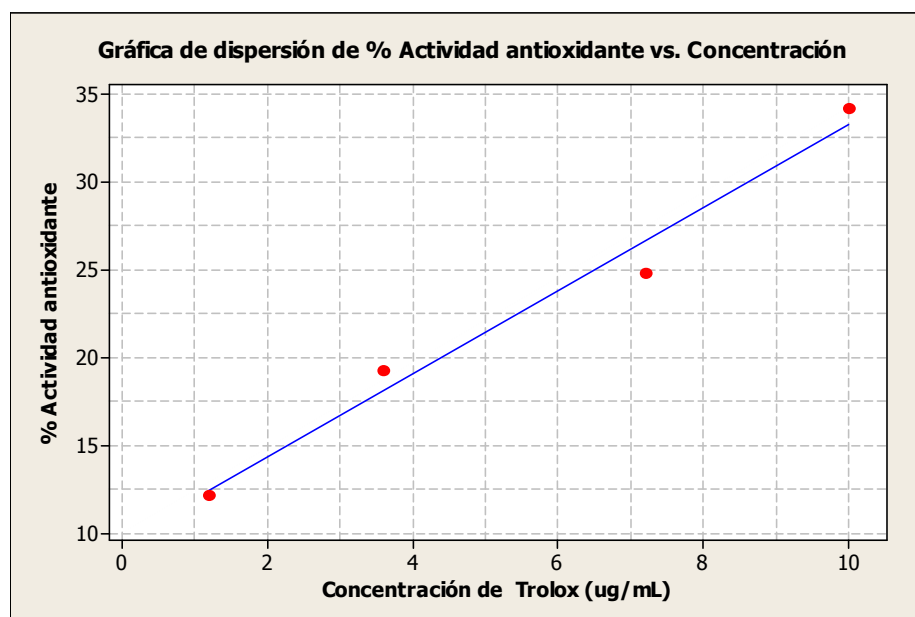
Método ABTS: solución patrón Trolox

En la tabla 10 se presentan los resultados del ensayo de la actividad antioxidante por ATBS para la solución patrón Trolox

Tabla 10. Resultados de la actividad antioxidante de trolox por el método de ABTS.

Sustancia antioxidante Solución patrón Trolox (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 734 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	ABTS (% inhibición)
0	0.695 (a)	0.003	0
1.2	0.610 (b)	0.002	12.14
3.6	0.561 (c)	0.001	19.20
7.2	0.522 (d)	0.003	24.78
10	0.457 (e)	0.006	34.23
EC50 (µg/mL)			17.04

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)



$$Y = 2.375X + 9.524, R^2=0.97$$

Figura 37. Correlación entre solución patrón de Trolox vs % de inhibición del radical ABTS *

4.2.3. Actividad antienzimática

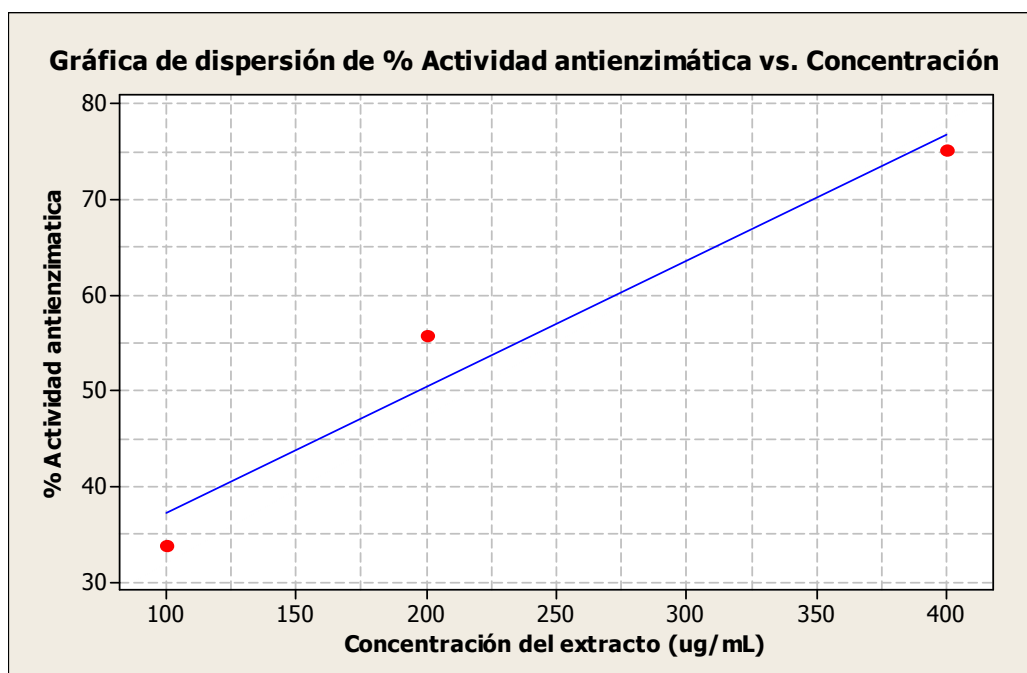
➤ Inhibición de la actividad de la enzima collagenasa: extracto hidroalcohólico de la vaina de tara

En la tabla 11 se presentan los resultados del ensayo de la inhibición de la enzima collagenasa por el extracto hidroalcohólico de la vaina de tara.

Tabla 11. Resultados de la actividad de la enzima collagenasa del extracto de tara.

Sustancia antienzimática Extracto de tara (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 348 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	anticolagenasa (% inhibición)
0	0.837 (a)	0.0187	0
100	0.555 (b)	0.0098	33.63
200	0.370 (c)	0.0130	55.78
400	0.208 (d)	0.0095	75.14
IC50 (µg/mL)			196.752

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa usando en método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)



$$Y = 0.1324X + 23.95, R^2=0.94$$

Figura 38. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición de la enzima collagenasa.

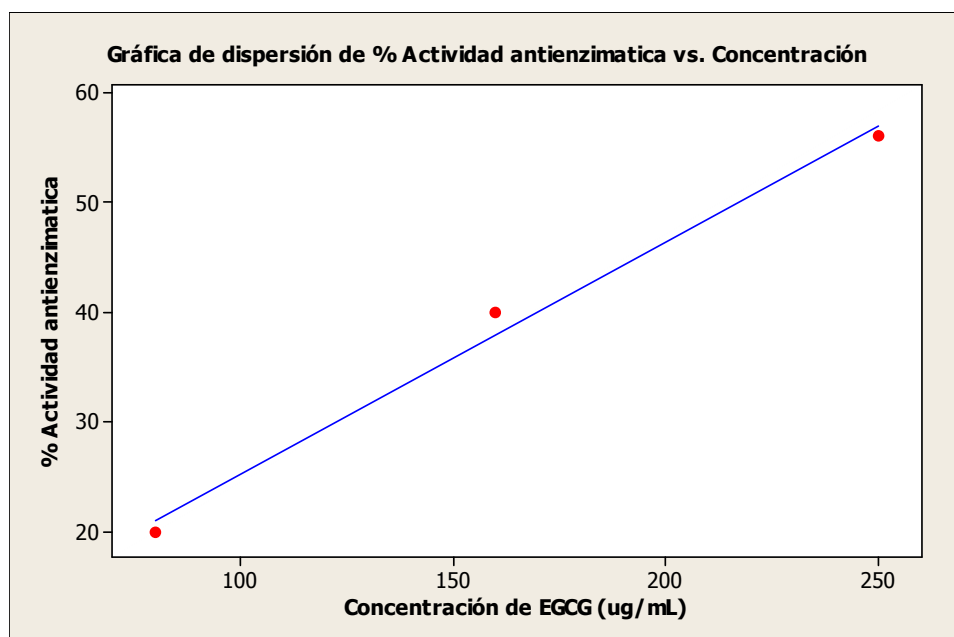
➤ **Inhibición de la actividad de la enzima colagenasa: patrón de referencia galato de epigallocatequina (EGCG)**

En la tabla 12 se presentan los resultados del ensayo de la inhibición de la enzima colagenasa por el galato de epigallocatequina (EGCG).

Tabla: 12. Resultados de la actividad de la enzima colagenasa de EGCG.

patrón de referencia galato de epigallocatequina (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 348 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	anticolagenasa (% inhibición)
0	0.828 (a)	0.0095	0
80	0.664 (b)	0.0291	19.850
160	0.497 (c)	0.0297	39.940
250	0.364 (d)	0.0244	56.04
IC50 (µg/mL)			216.991

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)



$$Y = 0.2122X + 3.954, R^2=0.99$$

Figura 39. Correlación entre galato de epigallocatequina vs % de inhibición de la enzima colagenasa.

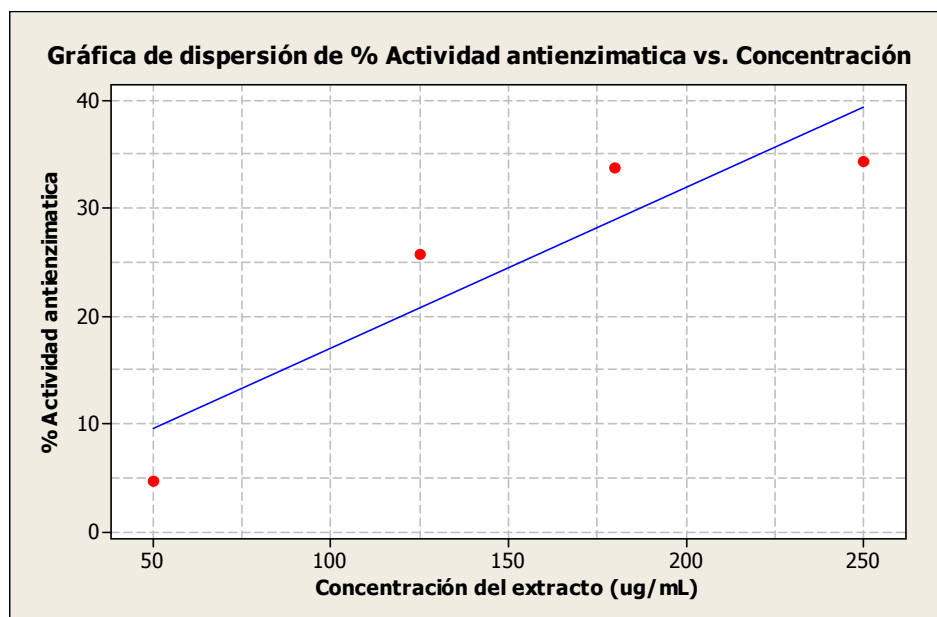
➤ **Inhibición de la actividad de la enzima elastasa: extracto hidroalcohólico de la vaina de tara**

En la tabla 13 se presentan los resultados del ensayo de la inhibición de la enzima elastasa por el extracto hidroalcohólico de la vaina de tara.

Tabla 13. Resultados de la actividad de la enzima elastasa del extracto de tara.

Sustancia antienzimática Extracto de tara (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 410 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	elastasa (% inhibición)
0	0.144 (a)	0.0045	0
50	0.137 (b)	0.0017	4.640
125	0.107 (c)	0.0247	25.754
180	0.095 (d)	0.0151	33.643
250	0.078 (e)	0.0100	34.339
		IC50 (µg/mL)	348.396

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)



$$Y = 0.1493X + 2.016, R^2 = 0.832$$

Figura 40. Correlación entre extractos hidroalcohólico de la vaina de tara vs % de inhibición de la enzima elastasa.

➤ **Inhibición de la actividad de la enzima elastasa: patrón de referencia galato de epigallocatequina (EGCG)**

En la tabla 14 se presentan los resultados del ensayo de la inhibición de la enzima elastasa por el galato de epigallocatequina (EGCG)

Tabla 14. Resultados de la actividad de la enzima elastasa de EGCG.

patrón de referencia galato de epigallocatequina (µg/mL)	Promedio Absorbancia a 410 nm (*)	Desviación estándar de los promedios de Absorbancia	elastasa (% inhibición)
0	0.110 (a)	0.0102	0
5	0.083 (b)	0.0046	24.55
10	0.065 (c)	0.0036	40.91
15	0.043 (d)	0.0035	60.91
IC50 (µg/mL)			12.1266

*Las letras distintas en las columnas indican diferencia significativa entre las medias usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. ($P \leq 0.05$)

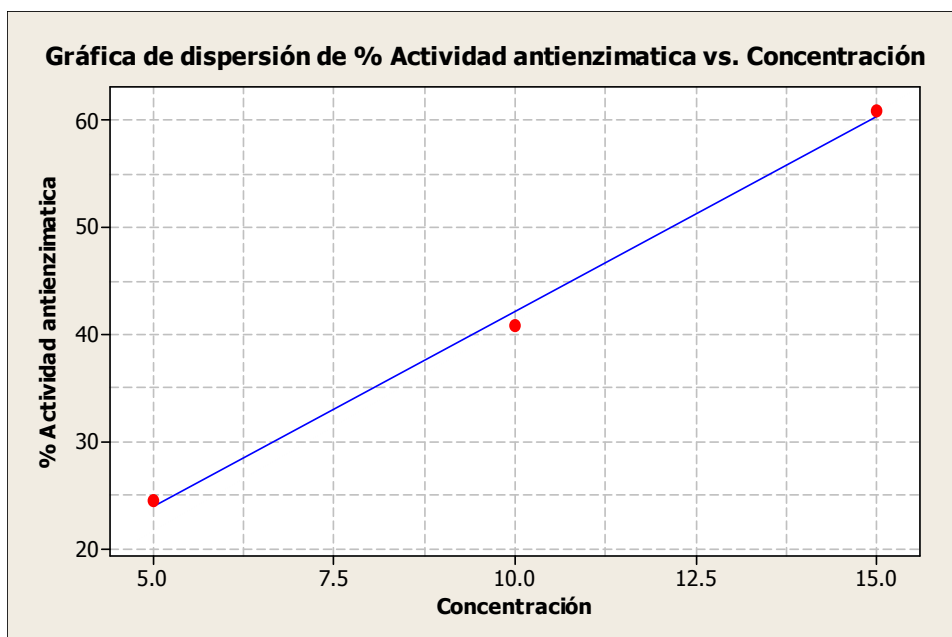


Figura 41. Correlación entre galato de epigallocatequina vs % de inhibición de la enzima elastasa.

V. DISCUSIÓN

Con el extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* se realizó el ensayo de solubilidad y la marcha fitoquímica para evaluar la fracción de metabolitos secundarios. Se reportó la presencia de fenoles, taninos, carbohidratos, flavonoides, antraquinonas y alcaloides.

En la determinación para la actividad antiinflamatoria se utilizó el extracto hidroalcohólico de las vainas a la que se atribuye diferentes propiedades, siendo muy aceptada por la medicina tradicional en aliviar problemas inflamatorios de garganta, ojos, sinusitis, infecciones vaginales y micóticas, heridas crónicas, reumatismo, etc. La evaluación de la actividad antiinflamatoria se ha realizado utilizando Λ carragenina. Se ha preferido trabajar con carragenina y no con otros agentes irritantes, dado que el edema que produce es menos modificable por factores ajenos a los característicos de la inflamación¹⁴³. La carragenina es considerada agente flogístico, en las ratas, se ha descrito que durante las primeras tres horas después de la administración por vía plantar de carragenina tipo lambda, produce un comportamiento bifásico. En la primera fase es mediada por la liberación de histamina, serotonina y quininas, en una segunda fase está asociada a la liberación de prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosoma, con un efecto máximo alrededor de 3 horas¹⁴⁴.

En la figura 32 se observa el aumento del volumen de la pata inflamada y es notoria la actividad de la carragenina produciendo aumento abrupto en el transcurso del tiempo, en comparación a otras sustancias que podría deducirse que poseen cierto efecto antiinflamatorio, así mismo en la sexta hora hubo

disminución en la curva de carragenina que podría explicarse por acción del propio organismo en frenar la inflamación.

La indometacina 5 mg/kg es un AINE que actúa sobre la cascada del ácido araquidónico inhibiendo no selectivamente a la COX, que suprime la formación de prostaglandinas y también inhibe la marginación, adhesión y migración de leucocitos, por lo que se considera un eficaz agente antiinflamatorio.

En la primera media hora el volumen de la inflamación de todos los extractos y el patrón no se observó diferencias significativas ($p= 0.787$, método Dunnett, fig. 32), en la primera hora tampoco se observó diferencias significativas con el fármaco de referencia ($p=0.129$) con respecto a la actividad de los extractos; a partir de la segunda hora la concentración de los extractos tuvo diferencias significativas. A la sexta hora se observó el pico más alto de inhibición de la indometacina y el extracto de 250 mg/kg (48,267 % y 44,854 % respectivamente).

En términos de eficiencia inflamatoria en la primera media hora se observó (fig. 33), el fármaco de referencia posee una marcada diferencia comparando los extractos 19.30 %. Respecto al extracto de concentración 250 mg/kg su porcentaje de inhibición fue 17.193 %. En la figura 33, el efecto antiinflamatorio de los extractos está muy relacionado a la concentración, a mayor concentración, mayor eficiencia inflamatoria. También se pudo observar disminución progresiva del edema con otras concentraciones en el tiempo, que no son muy significativos comparándose con el estándar. La disminución del edema se debe a la acción antiinflamatoria de los grupos fenólicos relacionados con la inhibición de diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico: ciclooxigenasa, lipoxigenasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa que reducen el estrés oxidativo; el

efecto también se debe a los flavonoides¹⁴⁵. *In vitro*, los flavonoides polihidroxilados actúan preferentemente por la vía 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidroxilos inhiben fundamentalmente la vía ciclooxigenasa. *In vivo*, sin embargo, parecen comportarse como inhibidores duales^{145,146}. Esta diferencia de comportamiento, no exclusiva de flavonoides, se debe a la biotransformación que sufren en el organismo. Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria en las que intervendrían los flavonoides serían: inhibición de la liberación de histamina, inhibición de la migración celular (en el proceso inflamatorio los leucocitos se dirigen por quimiotactismo hacia el foco inflamatorio, donde se activan liberando eicosanoides y otros agentes proinflamatorios), acción antirradicalaria (actuando frente a los radicales libres que se originan en la inflamación, efecto protector vascular (contribuye a disminuir la exudación). Muchos de los flavonoides y fenoles cooperan en el efecto antiinflamatorio; una explicación posible sería su actividad inhibidora de la prostaglandina sintetasa, impidiendo la síntesis de prostaglandinas componente responsable de la actividad inflamatoria¹⁴⁶.

A pesar que la vaina de tara presenta alto porcentaje de compuestos fenólicos comprobados *in vitro* por diversos autores, en el presente estudio, se esperaba mayor actividad antiinflamatoria inclusive mayor que el grupo control, una de las explicaciones del porqué un compuesto que posee alto contenido de compuestos fenólicos con propiedades antiinflamatoria comprobadas por diversos autores, podría deberse a la biodisponibilidad de estos grupos. Los polifenoles en mayor porcentaje no siempre son los más activos en el organismo, ya sea por su menor actividad intrínseca, baja absorción intestinal, que son altamente metabolizados

y/o su excreción rápida. En general, el metabolismo de los polifenoles se produce a través de una secuencia de reacciones comunes para similares a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos.

Para la actividad antioxidante se utilizaron los métodos ABTS y DPPH que permitieron evaluar su capacidad antioxidante, estos métodos *in vitro* proporcionan idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas, *in vivo*¹⁴⁷.

En este ensayo fue necesario valorar EC₅₀ que corresponde a la concentración necesaria para disminuir en 50 % la absorbancia inicial de DPPH; a valores más bajos del EC₅₀ resultaría mayor la actividad antioxidante. En esta prueba se observó una concentración constante de DPPH que permitió que, aunque se incrementa la concentración de la muestra, habra un límite de decoloración y, consecuentemente la absorbancia.

Se valoró la capacidad antioxidante mediante DPPH reportando un EC₅₀ de 4.520 µg/ml para el extracto hidroalcohólico de tara y un EC₅₀ de 5.04 µg/mL para la solución patrón trolox; y para el ensayo con ABTS presentó un EC₅₀ de 14.48 µg/ml para el extracto hidroalcohólico y un EC₅₀ de 17.04 µg/mL para la solución patrón trolox. En las tablas 7, 8, 9 y 10 donde se puede observar que el extracto hidroalcohólico de tara posee buena actividad antioxidante en el ensayo de DPPH y ABTS, es inclusive mayor a la del control positivo. Se demostró que todos los valores obtenidos en ambas pruebas según el análisis estadístico de ANOVA presentan un $P \leq 0.05$ por lo que se acepta la hipótesis alterna que dice: “que las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de tara poseen estadísticamente diferencias significativas entre sí”.

La mayor capacidad antioxidante del extracto hidroetanólico de la vaina de tara, es atribuible a la mayor concentración de compuestos fenólicos^{141,148}.

Al respecto se han realizado numerosos estudios que relacionan estructura actividad de polifenoles. Generalmente los monofenoles son antioxidantes menos eficientes que los polifenoles¹⁴⁹, sin embargo en el caso del ácido gálico y elágico el efecto inductivo de los tres grupos hidroxilos es tan importante, que se refleja en los valores de EC₅₀ y como consecuencia su actividad antioxidante aumenta.

Los taninos hidrolizables y condensados presentan buena actividad antioxidante, sin embargo, los taninos hidrolizables, han recibido menos atención en lo que se refiere a su impacto a la salud. Esto posiblemente es debido a las dificultades en su identificación, aislamiento, purificación y cuantificación^{43,150}. Debido a esto, es más fácil encontrar referencias que señalan mayor actividad biológica para los taninos condensados⁴⁵.

Las vainas de tara contienen en mayor porcentaje los taninos hidrolizables (galotaninos) en rango de 40 % a 60 % siendo las condiciones ecológicas una de las razones por que presenta buena actividad antioxidante.

La *Caesalpinia spinosa* presenta también taninos condensados, y la presencia de compuestos fenólicos hacen que sean secuestradores efectivos de radicales libres, que inhiben la oxidación de los tejidos mejor que la vitamina C, vitamina E y B caroteno⁵⁶. *In vitro* se ha demostrado que los taninos condensados poseen preferencia por neutralizar radicales libres hidroxilo (*OH). Se demostró que poseen capacidad de actuar como inhibidores no competitivos de las enzimas xantina oxidasa, una de las mayores generadoras de radicales libres en el metabolismo celular⁵⁶.

La tara presenta flavonoides que contienen en su estructura un número variable de grupos hidroxilo fenólicos que les confieren capacidad antioxidante. Las propiedades antirradicales libres de los flavonoides se dirigen fundamentalmente a los radicales hidróxidos y superóxidos, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

Los compuestos de naturaleza fenólica juegan papel importante en los procesos de oxidación lipídica y se les asocia con la actividad antioxidante. Los fitofenólicos exhiben actividad antioxidante/prooxidante, dependiendo de factores como: potencial reductor de metales, comportamiento quelante, pH, características de solubilidad, conformación estructural y número de grupos hidroxilos, entre otros.

La actividad antioxidante no solo depende de la EC_{50} , sino también del tiempo que necesita cada muestra para neutralizar al radical generado, porque no todos los compuestos reaccionan a la misma velocidad con el radical DPPH*. El número de DPPH* libres se reduce por cada número de grupos hidroxilos disponibles.

Se ha evidenciado en otros estudios que existe diferencia entre los resultados obtenidos que se debería al ambiente geográfico del que proceden. Al respecto, Flores y Chavarri (2005) señalan que la producción y productividad de las especies vegetales, además de otros factores, poseen relación directa con la procedencia biológica y geográfica de las semillas. Asimismo, señalan que la capacidad antioxidante en un alimento vegetal no viene sólo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada componente y del microambiente en que se halla el compuesto, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos¹⁴⁸. Se mencionan que deben tenerse en cuenta la capacidad antioxidante de una planta, podría deberse al efecto combinado de diversos

factores, como puede ser la presencia de otros metabolitos antioxidantes¹⁵¹. Al determinar el contenido de fenoles y flavonoides de tara, se menciona que la altitud y la radiación pueden incidir en la diferencia del contenido de estos compuestos en poblaciones situadas a diferentes regiones y alturas. Por los resultados obtenidos, en las poblaciones de “tara” muestreadas, también se estaría dando lo citado anteriormente¹⁵².

La comparación entre los resultados de capacidad antioxidante solo puede realizarse para un mismo método y para muestras obtenidas con los mismos solventes. Por otro lado, ciertos compuestos no oxidantes presentes en los vegetales, como aminoácidos y ácido urónico, pueden actuar interfiriendo, provocando resultados sobreestimados, por lo que su contenido debe evaluarse antes de aplicar estos métodos.

Para la actividad antienzimática, alrededor del 80 % del peso seco de la piel está constituida por proteínas del colágeno, la cual es responsable del tono de la piel. La enzima collagenasa se encarga de romper los enlaces peptídicos del colágeno y se estima que sustancias que inhiban las enzimas podrían usarse como agentes preventivos de aparición de arrugas. La enzima elastasa es una proteasa que degrada la proteína elastina, sumamente importante para la elasticidad de arterias, pulmones, ligamentos y piel. La actividad de la enzima elastasa aumenta con el paso de los años, conllevando a la disminución de la elasticidad de la piel y aparición de las arrugas.

Las enzimas collagenasa bacteriana y elastasa son enzimas proteolíticas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces peptídicos específicos en sus proteínas blancos que son el colágeno y la elastasa. La determinación de la inhibición de la

actividad colagenasa y elastasa se realizó por el método espectrofotométrico a una determinada longitud de onda y un tiempo y temperatura determinada.

Se determinó la actividad anticolagenasa utilizando extracto de tara donde se demostró que la inhibición de las enzimas colagenasas se inicia en concentraciones bajas y, continúa incrementando con la concentración. Esta prueba posee concentraciones constantes de enzima colagenasa y del sustrato que, aunque se incremente la concentración de la muestra, habrá un límite donde se expresa en la absorbancia. En la tabla 11 se muestran valores de inhibición los cuales oscilan en el rango de 33.63 % a 75.14 % de inhibición de la enzima colagenasa con IC_{50} 196.752 $\mu\text{g/mL}$. En la tabla 12 se determinó la actividad anticolagenasa con el compuesto de referencia galato de epigallocatequina que se obtuvo un IC_{50} de 216.991 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores demuestran que el extracto de tara posee buena actividad anticolagenasa, inclusive mayor a la del EGCG. Según el análisis estadístico de ANOVA presentan un $P \leq 0.05$ por lo que las medias de las absorbancia son estadísticamente diferentes en cada concentración del extracto.

La capacidad de inhibir esta enzima se debe a la presencia de taninos condensados. Se ha reportado que los taninos poseen actividad quelante, pudiendo formar precipitados con iones metálicos, como el zinc, metal componente del centro activo de la colagenasa, que impide la unión de ésta con el sustrato, de tal manera que un mayor contenido de taninos podría asociarse con un incremento en la fuerza de interacción de sus componentes con la colagenasa, que a su vez podría relacionarse con su actividad inhibitoria⁸. Es un tipo de inhibición reversible competitiva.

Respecto a los resultados, el potencial antielastasa (tabla 13) se obtuvo un IC_{50} de 348.396 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos de tara, en comparación del IC_{50} de 12.1266 $\mu\text{g/mL}$ que se obtuvo del compuesto de referencia EGCG. La tabla 13 muestra la creciente inhibición de las enzimas en presencia del extracto; que posiblemente se debió a la presencia de flavonoides libres, glucósidos y taninos condensados presentes en estos extractos; se observó que no presenta actividad antielastasa considerable, ya que el compuesto de referencia es más potente de inhibir el 50% de las enzimas con menor cantidad.

Es evidente que los inhibidores de las proteasas (colagenasa y elastasa) en vegetales no se presentan en cantidades y porcentajes iguales. Estos compuestos han sido identificados en una gran diversidad de especies vegetales.

Los valores de la actividad antiinflamatoria, antioxidante y la capacidad enzimática, fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 % ($p \leq 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Minitab 17.

En el estudio se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* “tara” posee capacidad antioxidante, antienzimática y antiinflamatoria.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* “tara” mostró actividad antioxidante en diferentes ensayos *in vitro* (DPPH y ABTS) mayor que el estándar de referencia, trolox.
2. El extracto hidroalcohólico inhibe la enzima colagenasa con mayor potencia que el control positivo epigallocatequina galato, sin embargo no presenta actividad significativa para la inhibición de la enzima elastasa.
3. La planta estudiada posee actividad antiinflamatoria a dosis dependientes, presentando diferencias significativas entre las medias de las sustancias ($p \leq 0.05$) a partir de la segunda hora hasta la sexta hora; sin embargo no es significativo al compararlo con el patrón de referencia (indometacina) a las mismas concentraciones.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De la Cruz P. Aprovechamiento Integral y Racional de la tara "*Caesalpinia spinosa*". Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. 2004; 7(14): p.2-10.
2. Agapito T, Sung I. Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales. Lima: Ed. Isabel. 1998; p.107-120.
3. López F, Garró V, Yrei V, Gallardo T. Acción antimicrobiana *Caesalpinia tintoría (Molina)* Kuntze "Tara", de diferentes regiones del Perú. Ciencia e Investigación 1998; 1: p.67-90.
4. Tomás-Lorente F. "Aportación al estudio de los flavonoides". Ed. Real Academia de Doctores de España. Madrid XXI. 2004.
5. Castillo S., Castillo V., Reyes A. Estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis* L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. *Albinus*. Scientia. 2010; 2(1): p.11-21.
6. García BL., Vicente GG., Rojo DD., Sánchez GE. Plantas con Propiedades Antioxidantes. Rev. Cubana Invest. Bioméd. 2001; 20(3): p.231-235.
7. Kim Y., Uyama H., Kobayashi S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320: p.256-261.
8. Melzig MF, Loser B, Ciesielski S: Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. Pharmazie 2001; 56: p.967-970.
9. Villanueva C. La Tara, el oro verde de los Incas. Lima. Ed. AGRUM. 1º edición. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2007; p.163-170.
10. Ananca C., Rene E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. 2009.
11. Andia H. Extracción de gomas de semillas de *Caesalpinia spinosa (Molina)* Kuntze "Taras" procedentes de las provincias de Cañete, Lima y Sucre.

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1994.

12. Rojas J. Estudio clínico experimental del tratamiento de la gingivitis crónica con *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "Tara" centro de salud Max Arias Shereiber. 1998.
13. Weberbauer A. El mundo vegetal de los andes peruanos: Estudio fitogeográfico. Estación Experimental Agrícola de la Molina. Dirección de Agricultura, Ministerio de Agricultura. Lima – Peru. 1945.
14. Saraf S, Kaur CD. Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. *Pharmacognosy Review*. 2010; 4(7): p.1-11.
15. Erlejman A., Verstraeten S., Fraga C., Oteiza P. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential determinant of Flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res*. 2004; 38: p.1311-1320.
16. Landines M., Zambrano J. La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. Bogota. 2009; 1(1): p.13-22.
17. Chanchal D., Swarnlata S. Herbal Photoprotective Formulations and their Evaluation. *The Open Natural Products Journal Review*. Institute of Pharmacy, Pt. Ravishankar Shukla University, Raipur. C.G. 492001, India. 2009; 2: p.71-76.
18. Gelse K., Poschl E., Aigner T. Collagens: Structure, Function and Biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2003; 55(12): p.1531–1546.
19. Fisher G., Wang Z., Datta S., Varani J., Kang S., Voorhees J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *New England J Medicine*. 1997; 337(20): p.1419–28. L Rittié, G Fisher. UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Research Reviews* 2002; 1(4): p.705-720.
20. Mori M., Ikeda N., Kato Y., Minamino M., Watabe K. Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro. *J. Cosmet. Dermatol*. 2002; 1: p.183-190.
21. García L., Rojo D., Gómez L., Hernández M. Plantas con Propiedades Antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2002; 21: p.214-216.

22. Salama A, Navarro L, Díaz F. Actividad antiinflamatoria, Dosis Letal 50 y Estudio Fitoquímico Preliminar de *Cucumis anguria*. Revista colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticos. 1994; 22: p.42-46.
23. Huarino M. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre flora salival mixta. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. UNMSM. Lima. 2011.
24. Correa J., Bernal Y. Especies Vegetales Promisionarias de los Países de Convenio Andrés Bello. Bogotá: SECAB Ciencia y Tecnología 17. 1990; 5: p.231-236.
25. Torres RJ. Contribución al conocimiento de las Plantas Tánicas registradas en Colombia. Instituto de ciencias naturales. Museo de Historia Natural. Biblioteca. 1983.
26. Araujo J., Córdova B., Rodríguez M. Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*. II Congreso Peruano de plantas medicinales y fitoterapia. Lima. 2003.
27. Hurtado BL. Estudio del contenido de derivados Antraquinónicos en *Caesalpinia spinosa*, Kuntze. Tesis de la Fac. Farmacia Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú. 1971.
28. Infantes A., Yanet E. Tratamiento de la gingivitis marginal crónica con pasta dental de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "Tara" en niños de 8 a 10 años. Tesis. Lima. 2004.
29. Sung I. Plantas Medicinales. 7ma. edición. Editorial Isabel. Lima. 2000.
30. Greulach A., Adams J. Las plantas: Introducción a la Botánica Moderna. 3ra ed. México D.F: LIMUSA. 2000; p.60-65.
31. Kondo K., Takaishi Y., Shibata H., Higuti T. ILSMRs (Intensifier of betalactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara". J Phytotherapy And Phytopharmacology. 2006; 13: p.209-212.
32. Siccha A, Lock O, Molina M. Determinación Cuantitativa de Galactomananos en las Gomas de Tara, Charán y Una de Gato, por Cromatografía de Gases. Bol. Soc. Quim. del Perú. 1994; 60: p.39-43.
33. Martínez FS, González GJ, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 2002; 17(6): p.271-278.

34. Pannala A, Chan TS, O'Brien, Rice-Evans C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2001; 282: p.1161-1168.
35. Evans T. *Farmacognosia*. España Editorial Interamericana Mc Graw-Will. España. 13a Edición. 1989; p.401-417.
36. Salazar S, Semi síntesis de un nuevo antibiótico beta-lactámico a partir del ácido gálico obtenido de la tara (*Caesalpinia spinosa kuntze*) por fermentación, Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. 2004; p.51-57.
37. Foyer CH., Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase: a proposed role in ascorbic acid metabolism *Plants*. London. 1976; 133: p.21-25.
38. Mantilla J. Manejo racional de plantas medicinales y aromáticas en terrenos marginales de la comunidad campesina de Viacha, anexo Tuksan Grande, Valle Sagrado de los Incas. Proyecto de IEPLAM. 2002; p.36-39.
39. Pizzi A. *Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry*. 1980; 18: p.247-255.
40. Sowunmi S, Ebewe O, Conner AH, River BH. *Journal of Applied Polymer Science*. 1996; 62: p.577-581.
41. Bruneton, J. *Farmacognosia, plantas medicinales*. 2da edición. España, Zaragoza: Editorial Ascribia S.A. 2001; p.229 y p.365-399.
42. Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de origen Natural*. 1ra ed. Barcelona-España: Omega. 2000; p.112-114.
43. Cotè, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J., Lacroix, M. Analyzing cranberry bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010; 9: p.872-888.
44. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. *Anales de la Facultad de medicina*. 1996; 57 (4): p.36-44.
45. Beecher, G. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *Journal of Nutrition* 2003; 133: p.3248-3254.
46. Isaza J. Taninos o Polifenoles, *Sciencia et Tecnica*, UTP, ISSN 0122-1701. 2007; XIII (33): p.13-18.

47. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. 1994; p.219-233.
48. Zhang L, Nkhata K, Shaik A, et al. Mouse Prostate Proteome Changes Induced by Oral Pentagalloylglucose Treatment Suggest Targets for Cancer Chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*. 2011; 11: p.787-798.
49. Jeong S., Koh W., Lee O., et al. Antiangiogenic Phytochemicals and Medicinal Herbs. *Phytotherapy Research*. 2011, 25: p.1-10.
50. King C., Chung W., Johnson M. Are tannins a doubleedged sword in biology and health *Trends in Food Science & Technology?* 1998; 9: p.168-175.
51. Alvarez A., Olga Lock de Ugaz, *Revista de Química*. 1992; Vol.(1): p.57-60.
52. Samil A, Alma MH, Acemioğlu B. *Journal of Applied Polymer Science*. 2005; 98: p.2450-2461.
53. Roux DG, Ferreira D, Botha JJ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980; 28: p.216-223.
54. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 2005; 66: p.2012-2031.
55. Chung K., Wei C., Johnson M. Are Tannins a double-edged sword in Biology and Health? *Food Science & Technology*. Memphis. 1998; 9: p.168-175.
56. Fine, A. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alternative medicine reviews*. Scottsdale. 2000; 55: p.144-1451.
57. Drago SME. Flavonoides Recombinantes de Relevancia Farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2007; 38 (4): p.45-47.
58. López LMT. Flavonoides. *Fitoterapia*. 2002; 21 (4): p. 108-114.
59. Paredes SF, Clemente FA. Polifenoles de aplicación en farmacia. *Fitoterapia*. 2005; 21(4): p.85-94.
60. Seigler SD. *Plant Secondary Metabolism*. Oklahoma, E.U.A. 1998; p.151-192.
61. Brielmann HL., Setzer WN., Kaufman PB., Kirakosyan A., Cseke LJ. *Phytochemicals: The Chemical Components of Plants*. En: Cseke LT,

- Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber S, Duke JA, Briemann HL (eds), Natural Products from Plants. 2da. edición. Taylor & Francis, E.U.A. 2006; p.19-25.
62. Geissman TA., Crout DHG. 1969. Organic chemistry of secondary plant metabolism. Freeman, Cooper & Company. E.U.A. 1969; p.183-230.
63. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. 2000; 63 (7): p.1035-1042.
64. Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry. 2006; 67: p.2058-2070.
65. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México D.F.: Limusa. 1979; p.281-290.
66. Leyva H, Quezada RD. Respuesta inflamatoria. En: Leyva HER, Gaitán CLA (eds.), Patología general e inmunología. Editorial Trillas, México D.F. 2008; p.149-184.
67. Elejalde G. Estrés Oxidativo, Enfermedades y Tratamientos Antioxidantes. An Med Interna. Madrid. 2001; 18(6): p.326-335.
68. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. Free Rad. Biol. Med. 1995; 19: p.481-486.
69. Caturla N., Vera-Samper E., Villalaín J., Mateo C., Micol V. The Relationship between the Antioxidant and the Antibacterial Properties of Galloylated Catechins and the Structure of Phospholipid Model Membranes. Free Rad. Biol. Med. USA. 2003; 34: p.648-662.
70. Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Debnam ES, Tyrrell RM, et al. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative stress-induced apoptotic cell death involving caspase-3 activation. Biochem. J. 2001; 354: p.493-500.
71. Schroeder EK, Kelsey NA, Doyle J, Breed E, Bouchard RJ, Loucks A, Harbison A, Linseman DA. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. Antioxid. Redox. Signal. 2008; 11: p.469-480.

72. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int*; 58 Suppl. 2000; 77: p.26-30.
73. Cadenas, E. Basic Mechanisms of Antioxidant Activity. *BioFactors*. Article. Oxford, England. 1997; 6: p.391-397.
74. Halliwell, B. Antioxidant Characterization - Methodology and Mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: p.1341-1348.
75. Rice-Evans CA, Packer L. *Flavonoids in health and disease*. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker Inc. 2003.
76. Dreosti I. E. *Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine*. Nutrition. Los Angeles, California. 2000; 16: p.692-694.
77. Williams CA, Harborne JB. Flavone and flavonol glycosides. In: J.B. Harborne, Editor. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London. 1994; p.337-385.
78. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trend. Food. Sci. Tech.* 2000; 11: p.152-160.
79. Yamaguchi K, Honda M, Ikigai H, Hara Y, Shimamura T. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral. Res.* 2002; 53: p. 19-34.
80. Croft, K. The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolics Acids. *Ann. NY Acad. Sci. USA.* 2004; 854: p.435-442.
81. Alonso J. *Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas*. 2da edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Isis. 1998; p.202-212.
82. Artech A., Vanaclocha B., Güenechea J. *Fitoterapia*. 3ª ed. Vademécum de prescripción. Plantas Medicinales. Barcelona: Masson. 1998.
83. Peris JB, Stübing G, Vanaclocha B. *Fitoterapia aplicada*. Valencia: COF de Valencia. 1995.
84. Goodman y Gillman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9na. Ed. Ediciones McGraw Hill Interamericana. Buenos Aires, Argentina. 2001.
85. Robbins B, Stanley S, Ramzi C. *Patología estructural y funcional*. México D.F: Ed. Interamericana. Flórez, Jesús Dir. "Farmacología humana" 2da Ed. Barcelona. 2000.

86. Kumar V., Cotran RS., Robbins SL. Patología Humana: Elsevier Health Sciences. España. 2008.
87. Roitt BJ, Male D, Roth D. Inmunología: Elsevier. Madrid, España. 2007.
88. Crotan R., Kumar V., Robbins SL. Patología estructural y funcional. 4ª. Edición. Volumen I. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores. 1990; p.39-67.
89. Kim HP., Son KH., Chang HW., Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. Journal of Pharmacological Sciences. 2004; 96: p.229-245.
90. Lansky EP., Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 109: p.177–206.
91. Burke A., Smyth E., FitzGerald GA. Agentes Analgésicos-Antipiréticos; Farmacoterapia de la Gota. En: Brunton LL., Lazo JS., Parker KL (eds.), Goodman & Gilman's. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 11va edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. 2007; p.671-696.
92. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacología. 5ta edición. España: Editorial Elsevier. 2004; p.217-260.
93. Srinivasan VS. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. J Nutr. 2001; 131: p.1349-1350.
94. Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur J Nutr. 2003; 42: p.29-42.
95. Day AJ., Williamson G. Biomarkers for Exposure to Dietary Flavonoids: a review of the current evidence for Identification of Quercetin Glycosides in Plasma. Br. J. Nutr. 2001; 1: p.105-110.
96. Fitó M., De la Torre R., Farré-Albaladejo M., Khymenetz O., Marrugat J., Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. Ann Ist. Super Sanita 2007; 43: p.375-381.

97. Piskula MK. Factors affecting flavonoids absorption. *Biofactors* 2000; 12: p.175-180.
98. Bolli A., Marino M., Rimbach G., Fanali G., Fasano M., Ascenzi P. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 398: p.444-449.
99. Henning SM., Aronson W., Niu Y., *et al.* Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *J. Nutr* 2006; 136: p.1839-1843.
100. Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002; 132: p.3577-3584.
101. Kravzov JJ., Altagracia MM. Situación de los agentes antiinflamatorios no esteroidales en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 1997; 28 (4): p.14-20.
102. Salama A, Avendaño IY. Actividad antiinflamatoria de δ -amirona y 4',7-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*. *Revista del Colegio de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*. 2005; 34 (2): p.117-121.
103. Lehninger AL., Lee Nelson D., Cox MM. *Lehninger: Principios de bioquímica*. 4ta ed. Barcelona: ediciones Omega. 2006.
104. Venero GJ. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Milit.* 2002; 31(2): p.126-133.
105. Rodríguez JM, Menendez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Milit.* 2001; 30(1): p.15-20.
106. Youngson R. *Antioxidante y Radicales Libres*. 3era ed. Madrid: Editorial EDAF. 2003.
107. Rueda C. *Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares*. 1era ed. Madrid: Ediciones Nowtilus S.L. 2010.
108. Brand-Williams W., Cuvelier ME, Berset C. Use a of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.* 1995; 25(1): p.25-30.
109. Vanacker H, Harbinson J, Carver TLW, Foyer CH. Antioxidant defenses of the apoplast. *Protoplasma*. 1998; 205: p.129-140.

- 110.Mittler R, Vanderauwera S, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 2004; 10: p.490-498.
- 111.Prasad TK. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant J. 1997; 10: p.1017-1026.
- 112.Asada K. Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. Methods Enzymol. 2006; vol. 141 (2): p.391-396.
- 113.Altaman N. Oxygen Healing Therapies: Para una óptima salud y vitalidad. 1era ed. México D.F: Étoile. 1996.
- 114.Ara R. Cien Plantas Medicinales Escogidas. 4ta edición. Madrid, España: Editorial EDAF S.A. 2004; p.45-50.
- 115.Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep. 2005; 24: p.255-265.
- 116.Takahama U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. Phytochemistry. 2004; 3: p.207-219.
- 117.Arrigoni O., De Tullio M. Biochim Biophys Acta. Ascorbic Acid: much more than just an antioxidant. 2002; 1569(1-3): p.1-9.
- 118.Thaipong KBoonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant from guava fruit extracts. J Food Compos Anal. 2006; 19: p.669-675.
- 119.De Bruyn PJ., Lim ASC., Looney MG., Solomon DH. Tetrahedron Letters. 1994; 35(52): p.9637-9790.
- 120.Pérez TG, Martinez SG. Los flavonoides como antioxidantes naturales. Acta farm. Bonaerense. 2001; 20(4): p.297-306.
- 121.Flores, F., Chavarri L. Guía para la selección de árboles plus para tres especies forestales nativas de la región andina. Consideraciones generales. Cajamarca, Perú. ADEFOR. 2005; p.52-60.
- 122.Garcia A. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Murcia. España. 2005.

123. Mansfiel SD, Mooney C, Sanddler J N, Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolisis. *Biotechnological progress*. 1999; 15: p.804-816.
124. Jovanovic SV., Steenken S., Simic MG., Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *Flavonoids in health and disease*. 1998; 4(1): p.137-161.
125. F'guyer S., Afaq F., Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2003; 19: p.56-62.
126. Mathew S, Abraham T. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by diferent methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. 2006; 44(2): p.198-206.
127. Lung M-Y, Chang Y-C. Antioxidant properties of the edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int. J. Mol. Sci*. 2011; 12: p.6367-6374.
128. Mensor L, Menezes F, Leitaog G, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res*. 2001; 15: p.127-136.
129. Hazra B., Biswas S., Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med*. 2008; 8: p.63-68.
130. Gupta M., Kanti U., Gomathi P., Sambath R. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Ervatamia coronaria* Stapf. Leaves. *Iran. J. Pharm. Res*. 2004; 3: p.119-126.
131. Özyürek M, Bektaoğlu B, Güçlü K, Apak, at el. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal. Chim. Acta* 2008; 616: p.196-208.
132. Thring TSA, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med*. 2009; 9: p.27-32.

133. Bae, J., Choi, J., Kang, S., Lee, Y., Park, J., Kang, Y. Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation. *Exp. Dermatol.* 2010; 19: p.182-190.
134. Middleton E, Kandaswami C. Effects of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* Mar 17. 1997; 43(6): p.1167-1179.
135. Moon JY, Yim EY, Song G, Lee NH, Hyun CG. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju island plants. *EurAsia J. BioSci.* 2010; 4: p.41-48.
136. Rancan F, Rosan S, Boehm K, et al. Protection against UVB irradiation by natural lters extracted from lichens. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2002; 68: p.133-143.
137. Gorriti A. *et al.* Manual de Farmacognosia y Productos Naturales Terapéuticos. UNMSM. Lima, 1993.
138. Sughisita E, Amagaya S, Ogihara Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmacol Biodyn. PubMed.* 1981; 4: p.565-575.
139. Winter CA, Porter CA. Effect of alteration in side chain upon antiinflammatory and liver glycogens activities of hydrocortisone esters. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957; 46(9): p.509-15.
140. Zuleta A, Esteve M, Frigola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry.* 2009; 114: p.310-316.
141. Kuskoski E. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas,* vol 24. 2004; 4: p.691-693.
142. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002; 7: p.405-410.
143. CyTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. Proyecto X-L Búsqueda de principios activos en plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* Ciudad de la Habana. 1995; 16(1): p.81-83.
144. Chakraborty A., Devi R., Rita S., Sharatchandra K., Singh T. Preliminary Studies on Antiinflammatory and Analgesic Activities of *Spilanthes acmella* in Experimental Animal Models. *Indian J. Pharmacol* 2004; 36: p.148-150.

145. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 2002; 53: p.1305-1319.
146. Ferrándiz L, Alcaraz M. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions. Revista PubMed.* 1991; 32: p.283-288.
147. Castañeda C., Ramos LI., Ibañez V. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Siete Plantas Medicinales Peruanas. *Revista Horizonte Médico. Volumen 8.* 2008; 1: p.56-72.
148. Muñoz J, Ramos E, Alvarado-Ortiz U, Castañeda C. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú.* 2007; 73 (3): p.142- 149.
149. Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. "Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants" *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 2: p.332-346.
150. Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez C, et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Function.* 2010; 3: p.233-253.
151. Fukumoto L., Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Revista PubMed.* 2000; 48: p.3597-3604.
152. Bedascarrasbure, E., Mmaldonado, L., Alvarez, A., Rodríguez E. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino. *Acta Farm. Bonaerense* 2004; 23 (3): p.369-372.
153. Rice-Evans C. Flavonoid Antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 2001; 8: p.797-807.
154. Sokmen M. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci. PubMed PMID.* 2005; 76 (25): p.2981-2993.

VIII. ANEXOS

ANEXO N° 1: Constancia emitida por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la clasificación de la tara.

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL 

"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 82-USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (Vainas), recibida de **Wilder Javier NUÑEZ ENERO** y **Raumir QUISPE TAPARA**, ha sido estudiada y clasificada como: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: FABACEAE

GENERO: *Caesalpinia*

ESPECIE: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Nombre vulgar: "Tara"
Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida
Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 23 de abril del 2014

 
Dña. Haydee Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS

ANEXO N° 2: Certificado sanitario de las ratas albinas

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLOGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO			
CERTIFICADO SANITARIO N°		090-2014	
Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 05 - 2014
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 30
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 meses a 2 meses ½
Peso	: 200 a 250 g.	Sexo	: Machos
G.R.	: 029508	Destino	: Tapara Quispe, Raomir UNMSM
Lima	: 09-05-2014		
El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández . Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.			
*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.			
Chorrillos, 09 de Mayo del 2014 (Fecha de emisión del certificado)			
NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.		 M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586	

ANEXO N° 3: Actividad antiinflamatorio

VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE MEDIA HORA

- ✓ **ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg y 250 mg/kg.**

Método

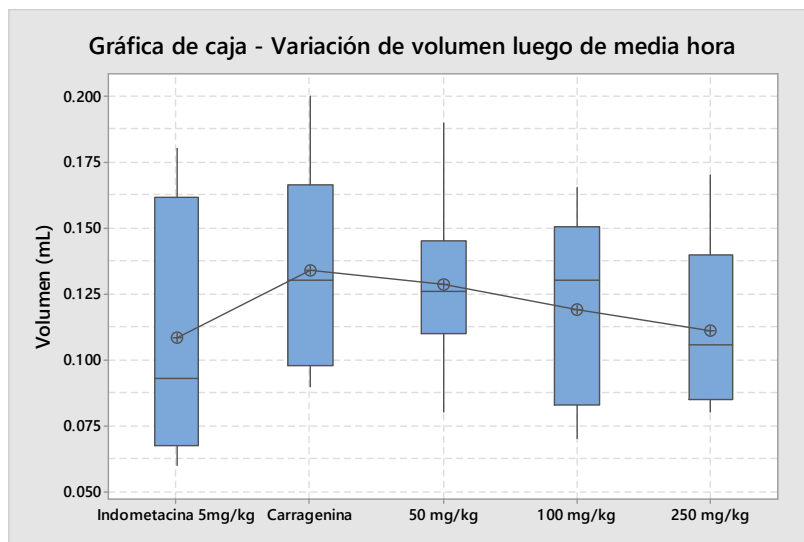
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.002834	0.000709	0.44	0.781
Error	23	0.037326	0.001623		
Total	27	0.040160			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.1085	0.0489	(0.0745, 0.1425)
Carragenina	6	0.1342	0.0418	(0.1001, 0.1682)
50 mg/kg	6	0.1287	0.0353	(0.0946, 0.1627)
100 mg/kg	5	0.1192	0.0371	(0.0819, 0.1565)
250 mg/kg	5	0.1111	0.0351	(0.0738, 0.1484)

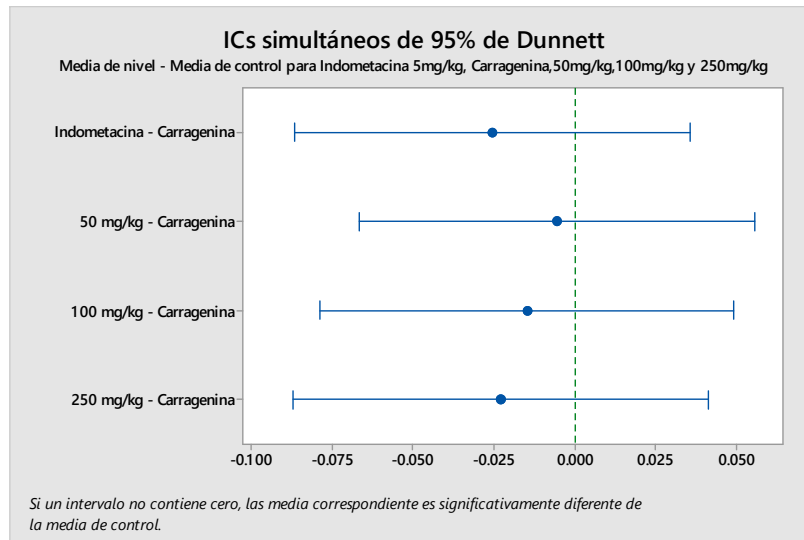


- ✓ **Comparaciones múltiples de Dunnett con un control**

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.1342	A
50 mg/kg	6	0.1287	A
100 mg/kg	5	0.1192	A
250 mg/kg	5	0.1111	A
Indometacina 5mg/kg	6	0.1085	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE UNA HORA

✓ ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50mg/kg, 100mg/kg, 250mg/kg

Método

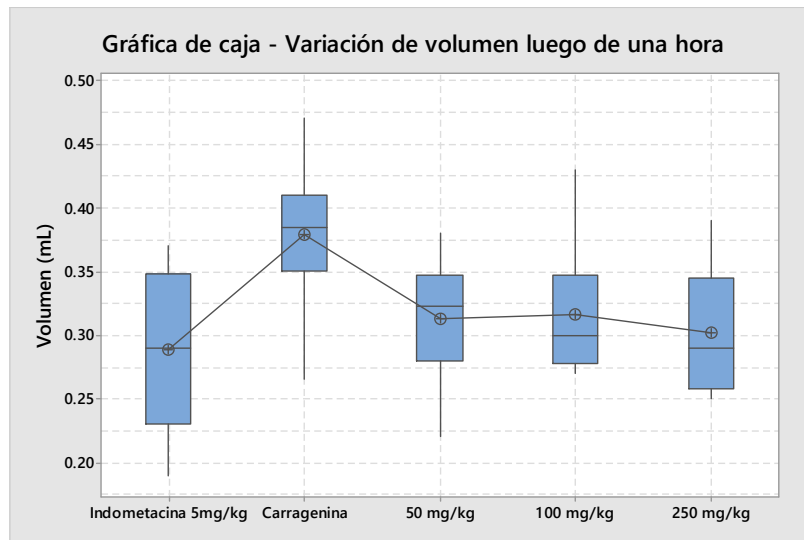
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.02779	0.006949	1.99	0.129
Error	24	0.08398	0.003499		
Total	28	0.11178			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	5	0.2891	0.0672	(0.2345, 0.3437)
Carragenina	6	0.3787	0.0654	(0.3289, 0.4286)
50 mg/kg	6	0.3134	0.0531	(0.2636, 0.3633)
100 mg/kg	6	0.3168	0.0583	(0.2669, 0.3666)
250 mg/kg	6	0.3017	0.0519	(0.2518, 0.3515)

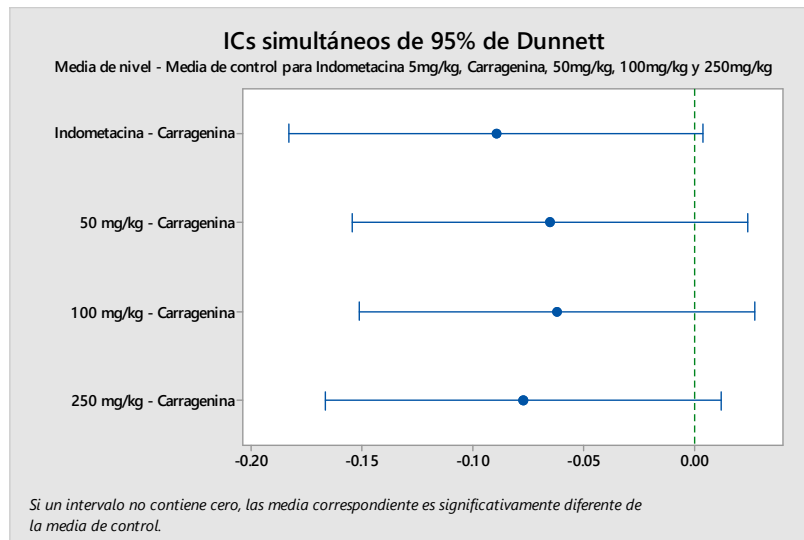


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.3787	A
100 mg/kg	6	0.3168	A
50 mg/kg	6	0.3134	A
250 mg/kg	6	0.3017	A
Indometacina 5mg/kg	5	0.2891	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE DOS HORAS

✓ ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg

Método

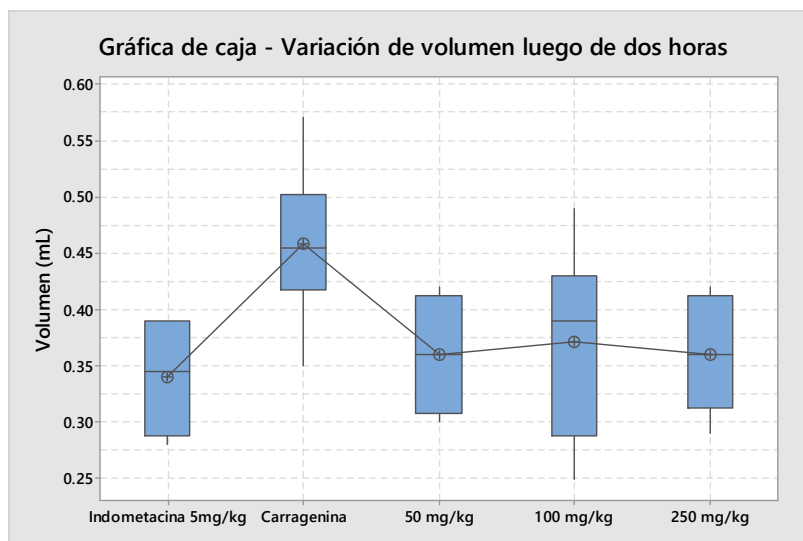
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.05151	0.012878	3.29	0.027
Error	25	0.09797	0.003919		
Total	29	0.14948			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.3400	0.0473	(0.2874, 0.3926)
Carragenina	6	0.4583	0.0714	(0.4057, 0.5110)
50 mg/kg	6	0.3600	0.0494	(0.3074, 0.4126)
100 mg/kg	6	0.3717	0.0852	(0.3190, 0.4243)
250 mg/kg	6	0.3600	0.0506	(0.3074, 0.4126)

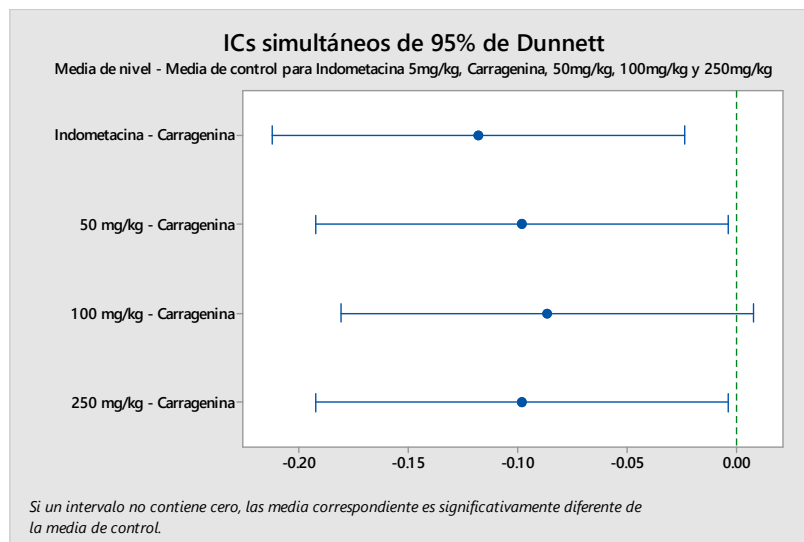


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.4583	A
100 mg/kg	6	0.3717	A
250 mg/kg	6	0.3600	
50 mg/kg	6	0.3600	
Indometacina 5mg/kg	6	0.3400	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE TRES HORAS

✓ **ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg**

Método

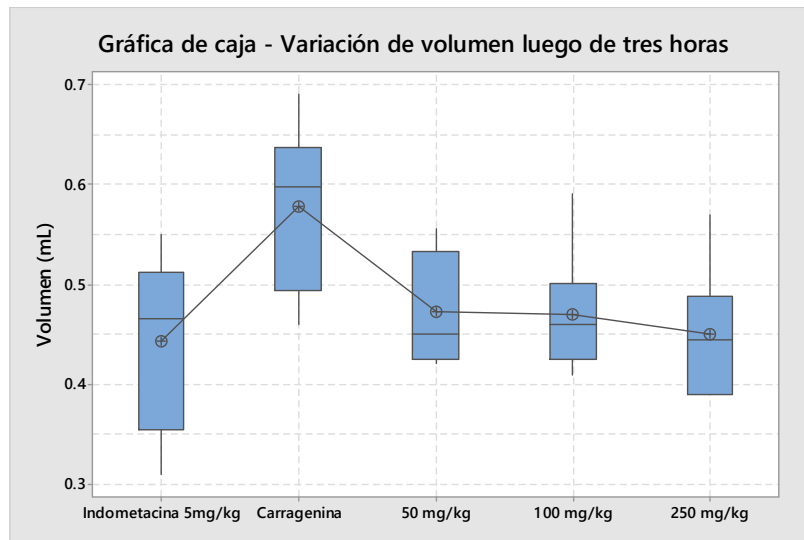
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.07220	0.018049	3.34	0.026
Error	24	0.12958	0.005399		
Total	28	0.20178			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.4433	0.0894	(0.3814, 0.5052)
Carragenina	6	0.5785	0.0831	(0.5166, 0.6404)
50 mg/kg	5	0.4731	0.0578	(0.4053, 0.5409)
100 mg/kg	6	0.4700	0.0632	(0.4081, 0.5319)
250 mg/kg	6	0.4500	0.0660	(0.3881, 0.5119)

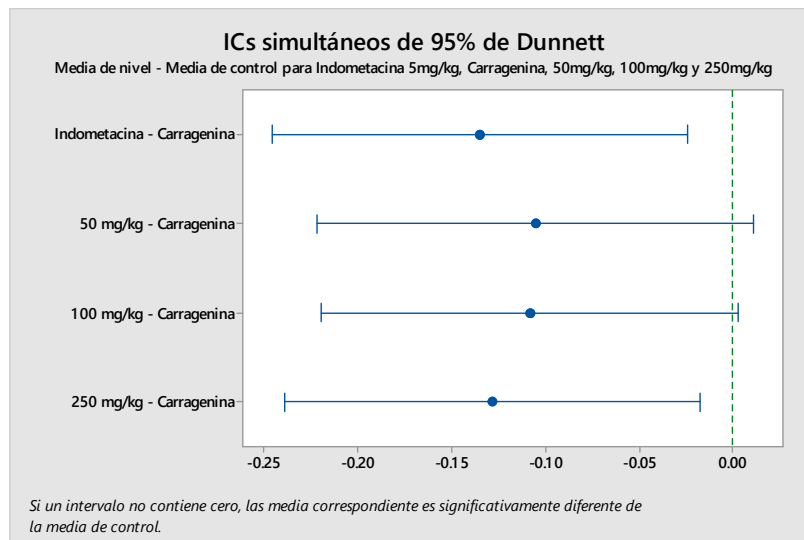


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.5785	A
50 mg/kg	5	0.4731	A
100 mg/kg	6	0.4700	A
250 mg/kg	6	0.4500	
Indometacina 5mg/kg	6	0.4433	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE CUATRO HORAS

✓ ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg

Método

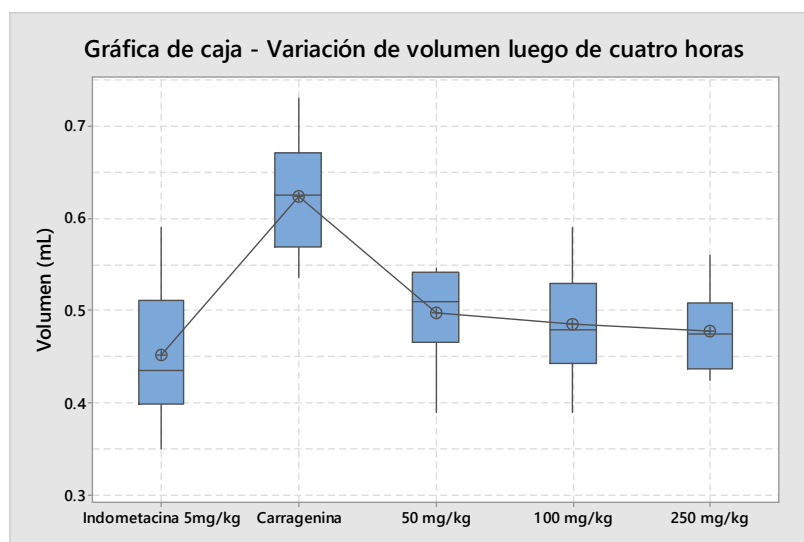
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.1094	0.027359	6.51	0.001
Error	25	0.1050	0.004202		
Total	29	0.2145			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.4518	0.0812	(0.3973, 0.5063)
Carragenina	6	0.6242	0.0671	(0.5697, 0.6788)
50 mg/kg	6	0.4976	0.0570	(0.4431, 0.5521)
100 mg/kg	6	0.4850	0.0666	(0.4305, 0.5395)
250 mg/kg	6	0.4774	0.0474	(0.4229, 0.5319)

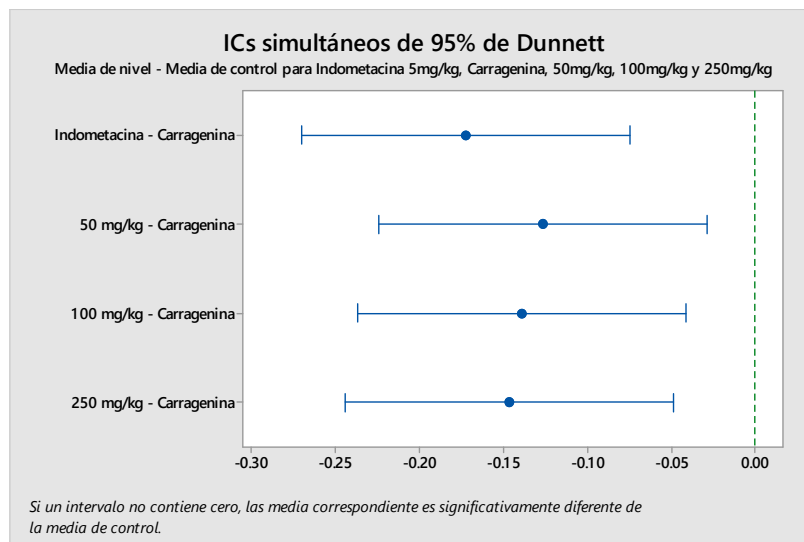


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.6242	A
50 mg/kg	6	0.4976	
100 mg/kg	6	0.4850	
250 mg/kg	6	0.4774	
Indometacina 5mg/kg	6	0.4518	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE CINCO HORAS

✓ **ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg**

Método

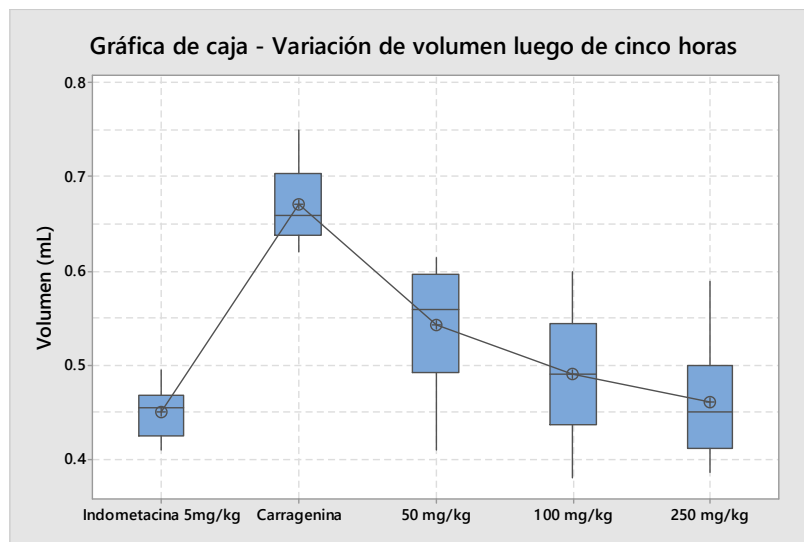
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.19415	0.048537	13.08	0.000
Error	25	0.09277	0.003711		
Total	29	0.28692			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.4508	0.0291	(0.3996, 0.5021)
Carragenina	6	0.6708	0.0454	(0.6196, 0.7221)
50 mg/kg	6	0.5425	0.0724	(0.4913, 0.5937)
100 mg/kg	6	0.4904	0.0742	(0.4392, 0.5417)
250 mg/kg	6	0.4609	0.0701	(0.4097, 0.5121)

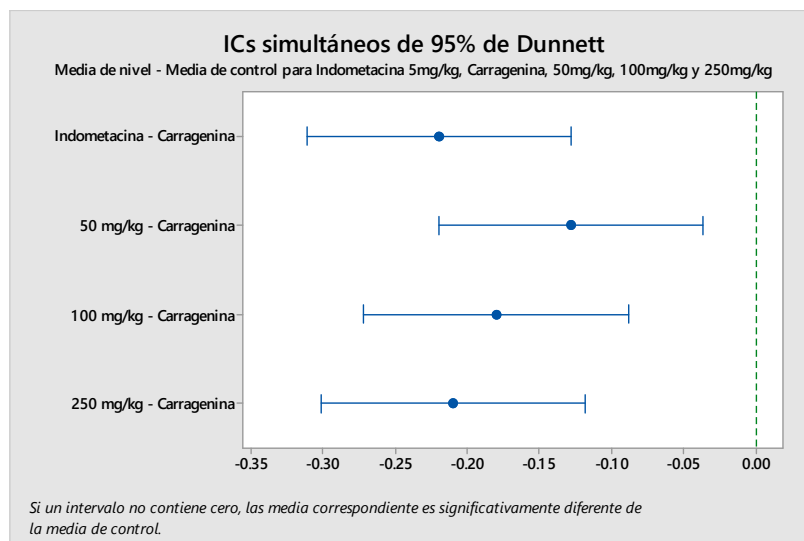


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.6708	A
50 mg/kg	6	0.5425	
100 mg/kg	6	0.4904	
250 mg/kg	6	0.4609	
Indometacina 5mg/kg	6	0.4508	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



VARIACIÓN DE VOLUMEN LUEGO DE SEIS HORAS

✓ ANOVA unidireccional: Indometacina 5mg/kg, Carragenina, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 250 mg/kg

Método

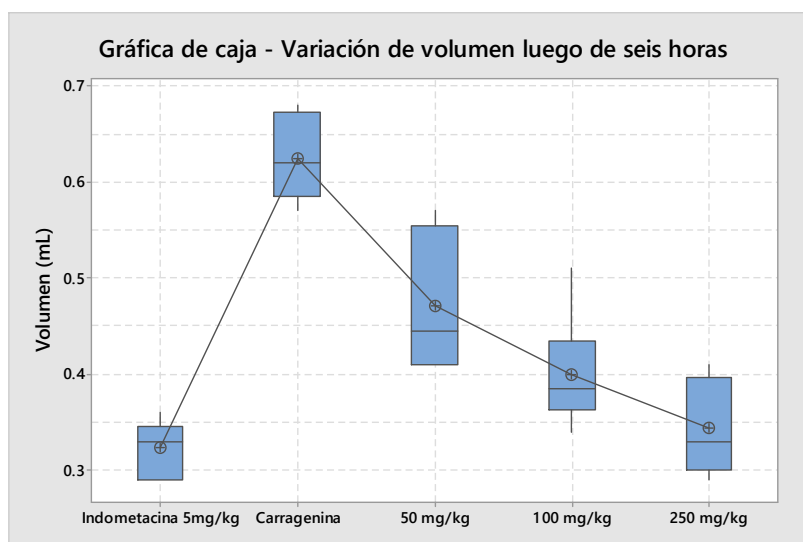
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	0.34761	0.086903	31.16	0.000
Error	24	0.06693	0.002789		
Total	28	0.41455			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Indometacina 5mg/kg	6	0.3233	0.0280	(0.2788, 0.3678)
Carragenina	6	0.6250	0.0437	(0.5805, 0.6695)
50 mg/kg	6	0.4717	0.0722	(0.4272, 0.5162)
100 mg/kg	6	0.4000	0.0587	(0.3555, 0.4445)
250 mg/kg	5	0.3447	0.0504	(0.2959, 0.3934)

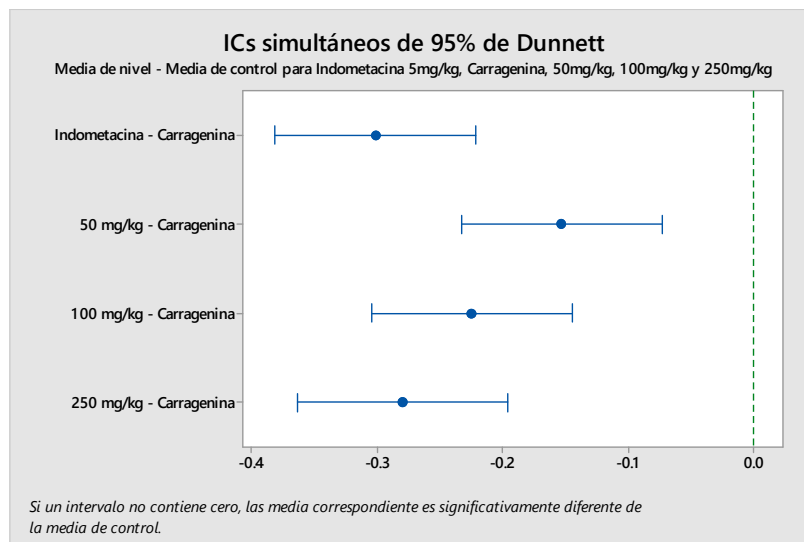


✓ Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Carragenina (control)	6	0.6250	A
50 mg/kg	6	0.4717	
100 mg/kg	6	0.4000	
250 mg/kg	5	0.3447	
Indometacina 5mg/kg	6	0.3233	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



EVALUACIÓN DE VALORES ATÍPICOS

En el análisis por comparaciones múltiples de Dunnett, se observaron valores atípicos los cuales no fueron considerados para el análisis de la actividad antiinflamatoria, para determinar estadísticamente se utilizó la prueba de Grubbs con un nivel de confianza de 95% ($p < 0.05$).

Prueba de valores atípicos:

- ✓ Extracto de 100mg/kg luego de 0.5 h
- ✓ Extracto de 250mg/kg luego de 0.5 h
- ✓ Indometacina luego de 1 h
- ✓ Extracto de 50mg/kg luego de 3 h
- ✓ Extracto de 250mg/kg luego de 6 h

Método

Hipótesis nula: Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

Hipótesis alterna: El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

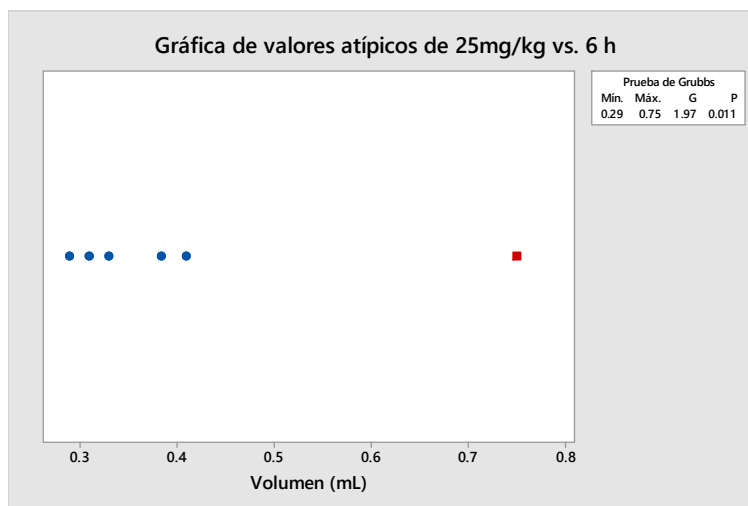
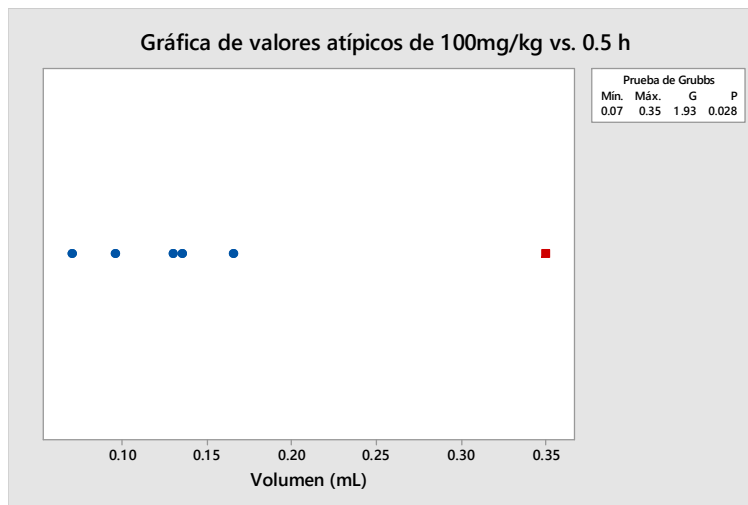
Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

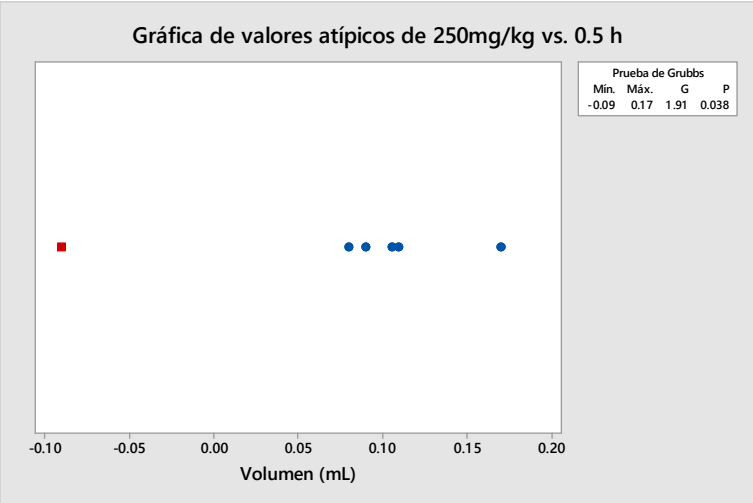
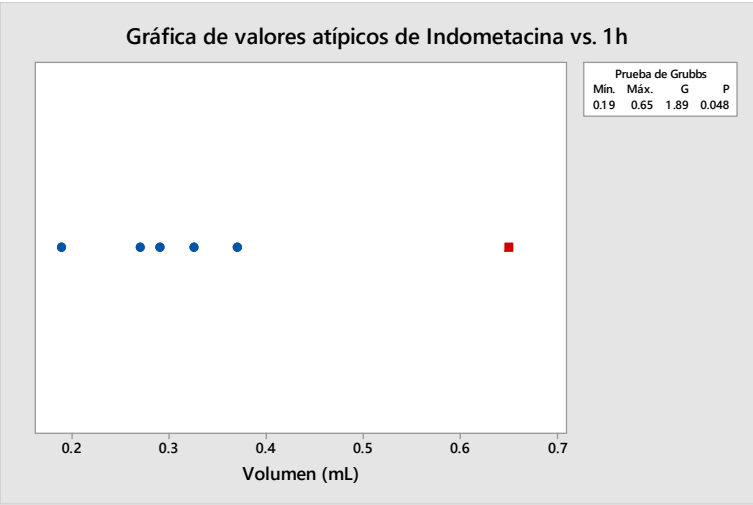
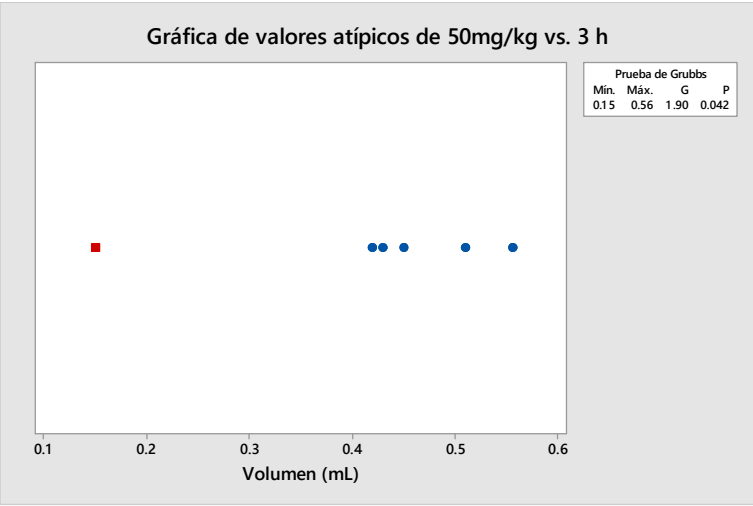
Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	Desv.Est.	Mín.	Máx.	G	P
100mg/kg vs 0.5 h	6	0.1577	0.0999	0.0700	0.3500	1.93	0.028
250mg/kg vs 0.5 h	6	0.0776	0.0879	-0.0900	0.1700	1.91	0.038
Indometacina vs 1h	6	0.3493	0.1591	0.1900	0.6500	1.89	0.048
50mg/kg vs 3 h	6	0.4192	0.1417	0.1500	0.5555	1.90	0.042
25mg/kg vs 6 h	6	0.4122	0.1715	0.2900	0.7500	1.97	0.011

Valor atípico

Variable	Fila	Valor atípico
100mg/kg vs 0.5 h	1	0.35
250mg/kg vs 0.5 h	6	-0.09
Indometacina vs 1h	6	0.65
50mg/kg vs 3 h	6	0.15
25mg/kg vs 6 h	1	0.75





ANEXO N° 5: Formato para la determinación de la actividad antiinflamatoria

Formato para la determinación de la actividad antiinflamatoria

Método: Edema de pata inducida por λ - carragenina en ratas

Fecha: _____

	Sugetos de estudio	Medición del volumen basal de la pata	Aplicación de los extractos o fármaco	Aplicación de la carragenina	Mediciones						
			-0.5 (h)	0 (h)	0.5 (h)	1 (h)	2 (h)	3 (h)	4 (h)	5 (h)	6 (h)
Suero Fisiológico	A1										
	A2										
	A3										
	A4										
	A5										
	A6										
Extracto 1: _____ mg/kg	B1										
	B2										
	B3										
	B4										
	B5										
	B6										
Extracto 2: _____ mg/kg	C1										
	C2										
	C3										
	C4										
	C5										
	C6										
Extracto 3: _____ mg/kg	D1										
	D2										
	D3										
	D4										
	D5										
	D6										
Fármaco patrón: _____ mg/kg	E1										
	E2										
	E3										
	E4										
	E5										
	E6										